

УДК 616.12:616-092.9

ИЗМЕНЕНИЕ ГОРМОНАЛЬНОГО СТАТУСА КРЫС И ВЫРАЖЕННОСТЬ СТРЕСС-РЕАКЦИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПОСТИНФАРКТНОМ И ДИАБЕТИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ МИОКАРДА

Егорова М.В., Реброва Т.Ю., Афанасьев С.А., Попов С.В.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт кардиологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Томск, e-mail: mwegorova@yandex.ru

Исследовано содержание гормонов, миоглобина в сыворотке крови и Bcl-2 в гомогенате миокарда на разных стадиях развития постинфарктного и диабетического повреждения миокарда крыс методом твердофазного иммуноферментного анализа. В качестве маркера и выраженности повреждения миокарда использовали уровень миоглобина в сыворотке крови. Для оценки стресс-реакции определяли уровни АКТГ, кортизола и соотношение кортизол/инсулин в сыворотке крови. Изменение содержания антиапоптозного белка Bcl-2 в клетках сердца использовали в качестве одного из маркеров интенсивности стресс-лимитирующих процессов. В результате сравнительного анализа исследованных показателей обнаружено, что стресс-реакция при сочетании инфаркт+диабет менее выражена относительно отдельных патологий и сочетания диабет+инфаркт. Выдвинуто предположение, что этот эффект обусловлен активацией стресс-лимитирующих систем вследствие перекрестной адаптации.

Ключевые слова: гормоны, стресс-реакция, адаптация, диабет, инфаркт миокарда

CHANGE OF THE HORMONAL STATUS OF RATS AND EXPRESSION OF STRESS-REACTION AT EXPERIMENTAL POSTINFARCTION AND DIABETIC MYOCARDIAL DAMAGE

Egorova M.V., Rebrova T.Y., Afanasiev S.A., Popov S.V.

Federal State Budgetary Institution «Research Institute for Cardiology» of Siberian Branch under the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, e-mail:mwegorova@yandex.ru

The content of hormones in serum at different stages of development of postinfarction and diabetic injury of rat myocardium by ELISA method was studied. Changing the content of myoglobin in serum as a marker of myocardial injury was used. The level of ACTH and cortisol and the ratio of cortisol/insulin in the blood serum to evaluate the stress response were used. Changing the content of antiapoptotic Bcl-2 protein in the cells of the heart as a marker of the intensity of the stress-limiting processes was used. A comparative analysis of the investigated parameters revealed that the stress-response was less pronounced in the group «myocardial infarction + diabetes» in comparison with individual pathologies and the group «diabetes + myocardial infarction». We were suggested that this effect is due to activation of stress-limiting systems as a result of cross-adaptation.

Keywords: hormones, stress-reaction, adaptation, diabetes, myocardial infarction

В наших ранних исследованиях показано, что индукция сахарного диабета (СД) на стадии формирования постинфарктного ремоделирования миокарда парадоксально повышает адаптивные возможности организма крыс (в сравнении с животными, имеющими монопатологии: постинфарктный кардиосклероз или СД), что, в свою очередь, способствует сохранению энергетического метаболизма и сократительной функции сердечной мышцы [4]. Нарушение кровоснабжения и инфаркт миокарда являются прямым вмешательством в работу сердца, что делает вполне реальным возможность активации специфических для данного органа защитных реакций. Однако СД трудно отнести к прямому воздействию на миокард, и нарушение метаболизма в данном случае является следствием изменений последнего на уровне всего организма. Соответственно, повышение устойчивости миокарда при сочетании патологий связано, скорее всего, с проявлениями неспецифической стресс-реакции. Такая реакция является не только

предшественником адаптивного ответа, но и играет важную роль в его формировании [2, 5, 6]. В классическом понимании общего адаптационного синдрома стадия истинной резистентности характеризуется комплексом изменений в нейроэндокринной системе и, в частности, увеличением секреции тропных гормонов и гормонов коры надпочечников [2, 5]. Различия в реакции миокарда на отдельные и сочетанные патологии могут быть обусловлены тем, что одни и те же стресс-факторы в зависимости от исходных условий могут восприниматься как различные по силе или степени биологической активности и этим определять качественно разные стандартные адаптационные реакции организма [2]. Исходя из вышесказанного, цель нашего исследования – провести сравнительный анализ и оценить выраженность стресс-реакции по изменению уровня стресс-гормонов в сыворотке крови крыс при развитии постинфарктного и диабетического повреждения миокарда крыс, а также их сочетании в эксперименте.

Материал и методы исследования

Исследования проведены на половозрелых крысах-самцах (250–300 г) линии Вистар. Было сформировано 5 групп животных (табл. 1): группа «контроль» – интактные животные; группа «инфаркт» – животные после моделирования инфаркта; группа «СД» – животные со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом; группа «инфаркт + СД» – постинфарктные животные с сахарным диабетом; группа «СД + инфаркт» – животные,

у которых после индукции сахарного диабета вызвали инфаркт миокарда.

Для моделирования инфаркта животным под эфирным наркозом по ранее описанной методике осуществляли перевязку левой передней нисходящей коронарной артерии [1, 3]. Развитие постинфарктных изменений верифицировали морфологически, гипертрофию миокарда определяли по соотношению массы сердца к массе тела и массы левого желудочка к массе сердца [1, 3].

Таблица 1

Экспериментальные группы животных и длительность моделируемых патологий

| Группы животных | Время между моделированием первой и второй патологии (недели) | Время между моделированием второй патологии и забоем животных (недели) | Общая длительность патологического воздействия (недели) | Число крыс в группе (n) |
|-----------------|---|--|---|-------------------------|
| «контроль» | – | – | – | 6 |
| «инфаркт»: | 6 | – | 6 | 6 |
| «СД»: | 6 | – | 6 | 6 |
| «инфаркт + СД»: | 4 | 2 | 6 | 6 |
| «СД + инфаркт» | 2 | 4 | 6 | 6 |

Сахарный диабет I типа индуцировали однократным введением стрептозотоцина («Sigma», США) в дозе 60 мг/кг внутривенно, разведенного 0,01 моль/л цитратным буфером (рН 4,5) [1]. Верификацию осуществляли по увеличению концентрации глюкозы в крови крыс в 3–4,5 раза, снижению массы тела, развитию полиурии и полидипсии [3].

Подробное описание постинфарктных и диабетических изменений во всех рассматриваемых группах приведено в работе [3].

Выраженность стресс-реакции определяли, используя в качестве классических маркеров стресса показатели уровня АКТГ и кортизола в плазме крови. Соотношение кортизол/инсулин использовали для дополнительной оценки стресс-реакции: его повышение отражает увеличение интенсивности катаболических процессов и снижение эффективности системы энергообразования [8]. АКТГ, кортизол, инсулин и миоглобин определяли в сыворотке крови, протеин Bcl-2 – в гомогенате миокарда крыс методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов производства Biomerica, США (АКТГ), ХЕМА, Россия (кортизол), Cusabio Biotech, Китай (миоглобин, инсулин), Usen Life Science, США (Bcl-2).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 6.0. Значения исследуемых показателей представлены в виде средней \pm ошибка средней ($M \pm m$). Статистическую значимость различий величин исследуемых параметров между сравниваемыми группами оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

Хорошо известно, что миоглобин обнаруживается в плазме крови при поражениях любого типа мышц и, в частности, является клиническим маркером некроза сердечной мышцы, ассоциированным

с инфарктом миокарда. В нашем исследовании обнаружено увеличение в 2,5–4,5 раза уровня сывороточного миоглобина при исследуемых патологиях (табл. 2). Как и ожидалось, выраженные изменения наблюдались не только, у животных в группе «инфаркт», но и в группе «СД». Это обусловлено, по-видимому, как опосредованным характером поражения персической мышцы при СД, так и возможным повреждением другого типа мышечных клеток. Косвенным подтверждением этого предположения является наиболее высокий уровень сывороточного миоглобина в группе «СД+инфаркт». Таким образом, моделирование обеих патологий как по отдельности, так и в сочетании является сильным стрессором, приводящим к соответствующим функционально-метаболическим изменениям в организме крысы.

При анализе показателей гормонального статуса в экспериментальных группах была выявлена только тенденция повышения уровня АКТГ в патологических группах по сравнению с аналогичным показателем в группе «контроль» (см. табл. 2). Возможно, что резких различий в содержании АКТГ не обнаружено из-за изменчивости содержания этого гормона в плазме крови в разное время суток и/или синтез АКТГ на рассматриваемых стадиях патологий ингибирован кортизолом по известному механизму отрицательной обратной связи. С этой точки зрения более информативным стало исследование по содержанию кортизола. Уровень кортизола в плазме крови повышался во всех экспериментальных груп-

пах в сравнении с группой «контроль». Так, этот показатель был практически в 2 раза выше при отдельных и в 3–4 раза – при сочетанных патологиях (см. табл. 2). Содержание инсулина в плазме крови было сниженным во всех группах с индуцированным диабетом относительно контроля, однако величина этого показателя варьи-

ровалась в зависимости от моделируемой патологии (см. табл. 2). Наиболее резкое (более чем в 6 раз) снижение уровня инсулина в сравнении с группой «контроль» ожидаемо наблюдалось в группе «СД», но при этом в группах сочетанной патологии снижение было значительно менее выражено – в 2–3 раза ниже контрольного уровня.

Таблица 2

Показатели стресс-реакции при постинфарктном и диабетическом повреждении миокарда

| Группы животных | Показатели | | | | | |
|-----------------|------------------|------------|----------------|------------------|------------------|--------------|
| | Миоглобин, нг/мл | АКТГ, нг/л | Кортизол, нМ/л | Инсулин, мкед/мл | Кортизол/инсулин | Vcl-2, нг/мл |
| «контроль» | 27 ± 1,5 | 74,4 ± 1,1 | 16,3 ± 0,5 | 9,3 ± 0,5 | 1,8 ± 0,1 | 12,7 ± 0,3 |
| «инфаркт» | 87 ± 3,6* | 85,6 ± 2,4 | 29,7 ± 1,9* | 8,3 ± 1,4 | 3,4 ± 0,6* | 14,1 ± 0,2 |
| «СД» | 94 ± 1,1* | 80,0 ± 2,3 | 30,6 ± 0,9* | 1,4 ± 0,16* | 21,6 ± 2,3* | 17,4 ± 0,4* |
| «инфаркт + СД» | 73 ± 1,5* | 86,1 ± 2,0 | 45,9 ± 5,0* | 4,2 ± 0,24* | 10,9 ± 0,5* | 21,7 ± 0,5* |
| «СД + инфаркт» | 125 ± 4,8* | 79,9 ± 3,2 | 74,4 ± 2,3* | 3,1 ± 0,1* | 24,1 ± 3,2* | 19,5 ± 0,9* |

Примечание. * – результаты в столбце статистически значимо ($p < 0,05$) отличаются от соответствующего показателя в группе «контроль».

Дополнительным параметром выраженности стресс-реакции при исследуемых патологиях явилось сопоставление содержания кортизола и инсулина в плазме крови по отношению друг к другу. Так, несмотря на то, что индекс кортизол/инсулин увеличен относительно контроля во всех экспериментальных группах, выявились значительные отклонения величины этого показателя в группах как с отдельными, так и сочетанными патологиями (см. табл. 2). Наиболее высоким индекс кортизол/инсулин оказался в группах «СД» и «СД + инфаркт», что обусловлено, в первую очередь, патологией поджелудочной железы. Однако при сочетании «инфаркт+СД» индекс кортизол/инсулин в 2 раза ниже, чем в группе «СД» (см. табл. 2). При этом важно отметить, что при сочетании «СД+инфаркт» индекс кортизол/инсулин был сопоставим с величиной этого показателя в группе «СД», несмотря на значительное повышение содержания в плазме крови кортизола и инсулина (см. табл. 2). В совокупности серьезные отклонения от контрольного уровня в величинах миоглобина, кортизола и индекса кортизол/инсулин свидетельствуют о более тяжелом протекании патологического процесса при сочетании «СД + инфаркт».

Увеличение выраженности стресс-реакции в группах «СД» и «СД + инфаркт» обусловлено, по-видимому, быстрым исчерпанием резервных свойств организма животных в указанных группах. Такие результаты могут быть свидетельством перехода процесса из стадии резистентности в стадию истощения [2, 5], то есть в стадию

дезинтеграции регуляторных и исполнительных механизмов [5, 6]. Возможно, это объясняется генерализованной реакцией организма вследствие мультиорганный поражения при диабете. Дополнительным подтверждением этому предположению являются полученные нами ранее данные по исследованию морфометрических (масса тела и сердца, степень гипертрофии миокарда) и метаболических (уровень глюкозы и свободных жирных кислот в плазме крови, скорость поглощения кислорода и разобщение окислительного фосфорилирования в митохондриях сердца) параметров при исследуемых патологиях [3]. Так, нами показано, что патологические проявления достаточно быстро развиваются на ранних стадиях в группах «инфаркт» и «СД», а при сочетанных патологиях этот процесс замедлен в 1,5–2 раза в сравнении с монопатологиями, особенно в сравнении с диабетом. При сравнении же показателей в группах сочетанной патологии обнаружено, что сочетание «СД + инфаркт» приводит к ухудшению всех рассмотренных показателей и повышению смертности животных по сравнению с моделью «инфаркт + СД» [3].

Некоторая отсрочка фатальных проявлений при сочетании патологий может быть обусловлена преобладанием процесса апоптоза кардиомиоцитов, что подтверждается характерными изменениями структуры клеток миокарда и отсутствием проявления воспалительной реакции, характерной для некроза [3]. Усиление апоптоза, в свою очередь, может активировать противоапоптотную систему: известно, что

гетеродимеризация между про- и антиапоптотическими представителями семейства Bcl-2 ингибирует проапоптотические белки [10]. Действительно, проведенное нами исследование уровня противоапоптотического протеина Bcl-2 в кардиомиоцитах животных при сочетанной патологии показало повышение содержания этого протеина в 1,5–2 раза относительно контрольной группы и в среднем на 30% – относительно монопатологий (см. табл. 2), что, возможно, и является причиной «торможения» потери функциональной активности и гибели кардиомиоцитов при сочетании патологий.

Меньшая выраженность стресс-реакции при сочетанной патологии относительно монопатологий может быть обусловлена перекрестной адаптацией и включением альтернативных, как специфических, так и неспецифических механизмов кардиопротекции. Известно, что одновременно с активацией стресс-реализующих систем происходит повышение активности сопряженных с ними стресс-лимитирующих систем, в частности, эндогенной опиоидной системы [5, 7], способной существенно влиять на функции организма именно в стадии истощения [4, 6]. Имеются многочисленные данные, свидетельствующие о прямом кардиопротекторном эффекте эндогенных опиоидов при гипоксии [9].

Таким образом, на основании проведенного исследования, можно заключить, что в условиях эксперимента ишемическое воздействие на сердечную мышцу вследствие инфаркта способствует наименьшей выраженности системной стресс-реакции и большему проявлению эффекта перекрестной адаптации при сочетании патологий «инфаркт + СД».

Список литературы

1. Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С., Попов С.В. Разработка модели сочетанной патологии сердечной недостаточности и сахарного диабета 1-го типа в эксперименте // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 153. – № 4. – С. 523–526.
2. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма. – Ростов-на-Дону: Ростовский ун-т, 1979. – 128 с.
3. Егорова М.В., Афанасьев С.А., Попов С.В. Состояние митохондрий и гипертрофия сердца при развитии стрептозотин-индуцированного диабета на фоне экспериментального инфаркта // Сибирский медицинский журнал (Томск). – 2011. – Т. 26. – № 3. – Вып. 1. – С. 119–124.
4. Шок: Теория, клиника, организация протившоковой помощи / Г.С. Мазуркевич, А.И. Тюкавин, Б.И. Джурко и др. // под ред. Г.С. Мазуркевич, С.Ф. Бягненко. – М.: Политехника, 2004. – 539 с.
5. Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам. – М.: Медицина, 1988. – 256 с.
6. Никонов В.В. Стресс: современный патофизиологический подход к лечению. – Харьков: Консум, 2002. – 240 с.
7. Парин С.Б. Роль эндогенной опиоидной системы в формировании экстремальных состояний: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 2010. – 50 с.
8. Различия в стресс-реакции и развитии адаптации к стрессу у крыс Август и Вистар / М.Г. Пшенникова, Л.Ю. Голубева, Б.А. Кузнецова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1996. – Т. 122. – № 8. – С. 156–159.
9. Роль опиоидных пептидов и полиаминов в коррекции кардиальных последствий антенатальной гипоксии / Е.Н. Сазонова, С.С. Тимошин // Дальневосточный медицинский журнал. – 2012. – № 4. – С. 119–123.
10. Самуилов В.Д., Олескин А.В., Лагунова Е.М. Программируемая клеточная смерть // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – № 8. – С. 1029–1046.

References

1. Afanasiev S.A., Kondratieva D.S., Popov S.V. Razrabotka modeli sochetannoj patologii serdechnoj nedostatochnosti i saharnogo diabeta 1-go tipa v eksperimente // Byulleten' eksperimental'noi biologii i mediciny. 2012. Vol. 153. no. 4. pp. 523–526.
2. Garkavi L. H., Kvakina E.B., Ukolova M.A. Adaptacionnye reaccii i rezistentnost' organizma. Rostov-na-Donu: Rostovskij universitet, 1979. 128 p.
3. Egorova M.V., Afanasiev S.A., Popov S.V. Sostoyanie mitohodrij i gipertrofiya serdca pri razvitii streptozotocin-inducirovannogo diabeta na fone eksperimental'nogo infarkta // Sibirskij medicinskij zhurnal (Tomsk). 2011. Vol. 26. no. 3(1). pp. 119–124.
4. Shok: Teoriya, klinika, organizaciya protivoshokovoj pomoshi / G.S. Mazurkevich, A.I. Tyukavin, B.I. Dzjurko et al. // eds. G.S. Mazurkevich, S.F. Bagnenko Moscow: Politehnika, 2004. 539 p.
5. Meerson F.Z., Pshennikova M.G. Adaptaciya k stressornym situacijam i fizicheskim nagruzkam. Moscow: Medicina, 1988. 256 p.
6. Nikonov V.V. Stress: sovremennyj patofiziologicheskij podhod k lecheniyu. Kharkiv: Konsum, 2002. 240 p.
7. Parin S.B. Rol' endogennoj opioidnoj sistemy v formirovanii ekstremal'nyh sostojanij: aftoref. diss. doktora biologicheskix nauk. Moscow, 2010. 50 p.
8. Razlichiya v stress-reaccii i razvitii adaptazii k stressu u krys Avgust i Vistar / M.G. Pshennikova, L.Yu. Golubeva, B.A. Kuznetsova et al. // Byulleten' eksperimental'noi biologii i mediciny. 1996. Vol. 122. no. 8. pp. 156–159.
9. Rolopioidnyh peptidov i poliaminov v korrrekcii kardial'nyh posledstvij atenatal'noi gipoksii / E.N. Sazonova, S.S. Timoshin // Dalnevostochnyj medicinskij zhurnal. 2012. no. 4. pp. 119–123.
10. Samuilov V.D., Oleskin A.V., Lagunova T.M. Programmiruemaya kletochnaya smert' // Biokhimiya. 2000. Vol. 65. no. 8. pp. 1029–1046.

Рецензенты:

Ласукова Т.В., д.б.н., профессор кафедры медико-биологических дисциплин, ФГБОУ ВПО «Томский государственный педагогический университет» Минобрнауки РФ, г. Томск;

Ворожцова И.Н., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой эндокринологии и диабетологии, ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск.

Работа поступила в редакцию 07.05.2013.