

ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЦИТОКИНЫ И ЭНДОТЕЛИЙЗАВИСИМАЯ ДИЛАТАЦИЯ ПРИ ОСТРОМ СТРЕССЕ

***А.П. Солодков¹, Н.М. Яцковская¹, Н.А. Крайнова²,
И.Н. Нечаев³, Е.Н. Князев², Д.Г. Максименко²***

¹Витебск, ВГУ имени П.М. Машерова,

²Москва, ООО НТЦ «БиоКлиникум»,

³ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН

Общая реакция на стрессоры включает в себя увеличение образования NO в развитии органных проявлений общего адаптационного синдрома, в том числе в клетках центральной нервной системы, надпочечниках, сердце и сосудах [3]. Экспрессия различных изоформ NO-синтаз в клетках сосудистой стенки изменяется при физиологических и патологических процессах, тем самым приводя к изменению вазодилатации. При этом не известно, NO образуемый каким из изоферментов играет важную роль в постстрессорных изменениях сосудистого тонуса [1]. В последние годы установлено, что воспаление вовлечено в развитие депрессивных состояний [5]. В сыворотке крови у таких пациентов обнаруживаются высокие концентрации белков острой фазы и цитокинов, таких, как интерлейкин-1 β и фактор некроза опухоли- α , являющихся индукторами образования индуцируемой NO-синтазы.

Возможно, вследствие экспрессии индуцированной iNOS, вызванной интерлейкинами, [7] и, таким образом, iNOS и NO становятся вовлеченными в патофизиологию воспаления, вызванного стрессом. Наименее изучена роль iNOS в регуляции тонуса артериальных сосудов при стрессе, связанном с ограничением двигательной активности, когда образование различного рода вазоактивных метаболитов в крови возрастает. Образование интерлейкинов находится под контролем глюкокортикоидов, катехоламинов и тиреоидных гормонов. Все эти гормоны принимают самое непосредственное участие в формировании стресса, возникающего в результате иммобилизации животного. Вполне вероятно, что эндокринный и цитокиновый ответы являются взаимосвязанными, однако они представляются сложными и плохо понятыми.

Целью работы было определить влияние острого стресса на концентрации ИЛ-1 β , ФНО- α в сыворотке крови, экспрессию индуцированной NO-синтазы в сосудистой стенке и эндотелийзависимую дилатацию аорты крыс.

Материал и методы. Опыты были выполнены на 67 беспородных белых крысах-самках массой 200–260 г. Животные были разделены на 2 группы: 1-я группа – интактные животные; 2-я группа – животные, перенесшие острый стресс.

Эксперименты проводили на изолированных кольцах аорты крыс, находящихся в установке TISSUEBATH 4CHANSYS (Biopacsystems, США) с использованием датчиков силы TSD125, соединенных с системой накопления данных MP150 (программа AcqKnowledge 4.1, Biopacsystems, США). Препарат функционировал в изометрическом режиме. Эндотелийзависимое расслабление оценивали классическим способом (предсокращали гладкомышечные клетки кольца аорты фенилэфрином, 10^{-6} М) с последующим кумулятивным добавлением в перфузионный раствор ацетилхолина от 1×10^{-10} до 3×10^{-5} М). Для выяснения роли iNOS использовали ее высокоселективный блокатор S-метилизотиомочевину (10 мкМ/л, SigmaUSA, Sigma, США). О чувствительности сосудов сердца судили по величине EC₅₀, представляющей собой концентрацию исследуемого вещества, вызывающую 50% ответную реакцию аортальных колец.

Острый стресс воспроизводился односторонней иммобилизацией животного в пластиковом пенале.

Выделение РНК iNOS проводили с помощью коммерческого набора miRNeasyKit (Qiagen). Концентрацию выделенных образцов РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 (ThermoScientific). Качество образцов РНК контролировали с помощью капиллярного электрофореза на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer (AgilentTechnologies). Значения параметра RIN (RNA integrity number) для всех образцов РНК были не ниже 7. Для iNOS, а также референсных генов Gapdh и Rplp1 были подобраны пары праймеров с помощью программ Primer3 (v. 0.4.0) и Primer-BLAST. Энергия образования вторичных структур контролировалась обработкой последовательностей олигонуклеотидов в программе OligoAnalyzer 3.1. Специфичность амплификации проверяли по электрофоретической подвижности ПЦР-продуктов в 2,5% агарозном геле. Реакцию обратной транскрипции проводили для 500 нг РНК с

использованием коммерческого набора «Синтол» с 2,5 кратной буфером, содержащим дНТФ (Россия). На одну реакцию ПЦР-РВ брали 5 мкл разбавленной в 25 раз смеси после обратной транскрипции. Концентрации праймеров составляли 250 нМ, Mg^{2+} – 5 мМ в объеме 25 мкл. За накоплением продукта в процессе ПЦР-РВ следили по увеличению флуоресцентного сигнала интеркалирующего красителя SYBR Green I (Invitrogen) с помощью амплификатора ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология») с использованием программы RealTime PCR v.7.3. Для каждой пары праймеров реакция проводилась параллельно в трех лунках.

Уровни цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 β определяли в сыворотке крови крыс, методом твердофазного иммуноферментного анализа, используя тест-системы и реагенты ТОО «Цитокин» (С-Петербург), ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирская область, п. Кольцово), с помощью фотометра универсального Ф-300 ТП. Чувствительность наборов для определения ФНО- α была 2 пкг/мл, ИЛ-1 β – 1 пкг/мл.

Определение гормонов в сыворотке крови животных проводили с использованием наборов реактивов – РИА – T_3 – ст.; РИА – T_4 – ст.; ИРМА – ТТГ – ст.

Обработка полученных результатов осуществлялась с применением пакета статистических программ Microsoft Excel 2000, STATISTICA 6.0, а также программного обеспечения GraphPadPrism (SanDiego, California, USA). Для сравнения двух количественных признаков применялся t-критерий Стьюдента. Различия принимали достоверными при значении вероятности ошибки $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В контрольной группе животных после добавления ацетилхолина дилатация кольца аорты начиналась при концентрации 1×10^{-7} М и составляла 23,4%. При этом максимальная дилатация развивалась при концентрации ацетилхолина в перфузионном растворе 3×10^{-5} М и достигала 57%. Добавление в перфузионный раствор высокоселективного блокатора iNOS S-метилизотиомочевина в контрольной группе животных не оказало влияния на выраженность эндотелийзависимой дилатации кольца аорты.

В группе животных, перенесших острый стресс, реакция кольца аорты на ацетилхолин значительно различалась. Это дало нам возможность разделить всех стрессированных животных на две подгруппы. В первой подгруппе «острого стресса» максимальная дилатация достигала 87,5% при концентрации ацетилхолина 1×10^{-5} М (на 30,5% больше, чем в контроле, $p < 0,05$). При этом в данной подгруппе животных, перенесших стресс, наблюдалось увеличение чувствительности гладкомышечных клеток аортальных сосудов к ацетилхолину. EC_{50} составила при остром стрессе – $6,38 \times 10^{-8}$ М, тогда как в контроле – $1,51 \times 10^{-7}$ М, ($p < 0,05$). В первой подгруппе животных, перенесших острый стресс, инкубирование сегмента аорты с S-метилизотиомочевинной устраняло влияние острого стресса. Дилатация изолированного кольца аорты становилась такой же, как в контроле. Она начиналась при концентрации ацетилхолина 1×10^{-7} М, а ее максимум достигался при концентрации ацетилхолина 3×10^{-5} М и составлял 60% (в контроле 57%). Чувстви-

тельность гладкомышечных клеток аортальных сосудов животных этой подгруппы также возвращалась к контрольным величинам и составила $1,07 \times 10^{-7} \text{M}$ (у этих же животных без S-метилизотиомочевины EC_{50} было $6,36 \times 10^{-8} \text{M}$).

Анализ первого типа реакции позволяет заключить, что усиление вызываемой ацетилхолином дилатации изолированного кольца аорты, которое блокировалось селективным ингибитором индуцируемой NO-синтазы S-метилизотиомочевинной, очевидно, было обусловлено увеличением образования монооксида азота, синтезируемого индуцибельной NO-синтазой.

Во второй подгруппе «острого стресса» после добавления ацетилхолина максимальная реакция достигалась при концентрации ацетилхолина $3 \times 10^{-5} \text{M}$ и составляла 52,8%, т.е. практически не отличалась от контрольных животных и была нами расценена, как атипичная реакция. Концентрация ацетилхолина, вызывающая 50% ответную реакцию гладкомышечных клеток аортальных сосудов, в этой подгруппе «острого стресса» также достоверно не отличалась от контроля и равнялась $1,78 \times 10^{-7} \text{M}$ (в контроле $\text{EC}_{50} - 1,51 \times 10^{-7} \text{M}$). В этой подгруппе «острого стресса» инкубирование сегмента аорты с S-метилизотиомочевинной сопровождалось существенным усилением вызываемого ацетилхолином расслабления гладкомышечных клеток аорты и возрастанием ее чувствительности к нему.

Подобный тип реагирования свидетельствует о том, что в клетках аорты этой подгруппы крыс, перенесших 60-минутную иммобилизацию, также появляется iNOS, однако она не производит характерного для нее большого количества NO. Более того S-метилизотиомочевина усиливает образование NO и, как следствие, вызываемую ацетилхолином эндотелийзависимую дилатацию аорты крыс, перенесших иммобилизацию. Подобное возможно лишь в том случае, если у вновь образовавшейся iNOS субъединицы разобщены и такой фермент вместо NO производит либо только, либо в значительной степени супероксидрадикал, который обладает вазоконстрикторными свойствами [6]. В этом случае он соединяется с NO, синтезирующимся конститутивной синтазой монооксида азота (eNOS), и уменьшает его биологическую доступность. Наступающее после ингибирования iNOS усиление вызываемой ацетилхолином эндотелийзависимой дилатации аорты стрессированных крыс скорее всего может быть обусловлено как стресс-индуцированным повышением активности eNOS, так и увеличением биодоступности синтезируемого ею NO.

60-минутная иммобилизация сопровождалась двукратным увеличением кортикостероидной активности плазмы крови, снижением уровня тироксина, трийодтиронина на 16 и 10% соответственно ($p < 0,05$, по сравнению с контролем), а также закономерным возрастанием уровня ТТГ на 45%. Под влиянием 60-мин иммобилизации в сыворотке крови достоверно увеличивалась концентрация ИЛ-1 β и появлялся ФНО- α . Эти данные согласуются с результатами других исследователей, которые в своих работах показали взаимосвязь между увеличенной продукцией цитокинов и снижением уровня трийодтиронина [2, 4, 8]. В результате проведенной обратной транскрипционной ПЦР в реальном времени в аортах крыс, перенесших острый стресс,

было обнаружено увеличение мРНК iNOS в 2,5 раза по сравнению с контролем, что указывает на активацию генов, отвечающих за синтез данного фермента.

Заключение. Таким образом, можно заключить, что под влиянием острого стресса (60-минутное ограничение двигательной активности) образуются провоспалительные интерлейкины ИЛ-1 β и ФНО- α , которые индуцируют активность генов, отвечающих за синтез iNOS. Последняя может находиться в двух различных состояниях (сопряженном и разобщенном), при которых синтезирует различное количество NO, ответственного за изменение индуцируемой ацетилхолином эндотелийзависимой релаксации кольца аорты и ее чувствительности к нему.

Список литературы

1. Манухина Е.Б., Лапшин А.В., Устинова Е.Е. Меерсон Ф.З. Влияние экспериментального инфаркта миокарда и эмоционально-болевого стресса на эндотелийзависимые реакции изолированной аорты крысы. Физиол. ж. СССР им. И.М. Сеченова. – 1989. – Т. 75. № 10. – С. 1409–1416.
2. Boelen A., Maas M.A., Lowik C.W., Platvoet M.C., Wiersinga W.M. Induced illness in interleukin-6 (IL-6) knock-out mice: a causal role of IL-6 in the development of the low 3, 5, 3-triiodothyronine syndrome // *Endocrinology*. – 1996. – Vol. 137. – P. 5250–5254.
3. Busnardo C., Tavares R.F., Resstel L.B., Elias L.L., Correa F.M. Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. *AutonNeurosci*. – 2010. – Vol. 158. – P. 51–57.
4. Davies P.H., Black E.G., Sheppard M.C., Franklyn J.A. Relation between serum interleukin-6 and thyroid hormone concentrations in 270 hospital in-patients with nonthyroidal illness // *ClinEndocrinol (Oxf)*. – 1996. – Vol. 44. – P. 199–205.
5. Hayley S. Toward an anti-inflammatory strategy for depression // *Front BehavNeurosci*. – 2011. – Vol. 5. – P. 1–7.
6. Kietadisorn R., Juni Rio P., Moens An. L. Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities // *Am J PhysiolEndocrinolMetab*. – 2012. – Vol. 302. – P. E481–E495.
7. O'Connor K.A., Johnson J.D., Hansen M.K., Wieseler Frank J.L., Maksimova E., Watkins L.R., Maier S.F. Peripheral and central proinflammatory cytokine response to a severe acute stressor // *Brain Res*. – 2003. – Vol. 991. – P. 123–132.
8. Serum triiodothyronine levels and inflammatory cytokine production capacity / Maarten P. [et al.] // *AGE*. – 2012. – Vol. 34. – P. 195–201.