© Тарасенко Л. М., Білець М. В., Омельченко О. Є., Цубер В. Ю., Горголь Н. І.

УДК: 616-002-092.9:613.22+613.86

Тарасенко Л. М., Білець М. В., Омельченко О. Є., Цубер В. Ю., Горголь Н. І.

МАКРОФАГАЛЬНА РЕАКЦІЯ ЯК МАРКЕР СИСТЕМНОГО ЗАПАЛЕННЯ ПРИ ВИСОКОКАЛОРІЙНОМУ ХАРЧУВАННІ ТА ІММОБІЛІЗАЦІЙНОМУ СТРЕСІ У ЩУРІВ

ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія» (м. Полтава)

bcp-p.ua

Дана робота є фрагментом НДР «Метаболічні зміни та стресостійкість органів травлення та кісткової тканини при поєднанні впливів ожиріння і емоційного стресу», № держ. реєстрації 0114U001457.

Вступ. В останні десятиріччя широко розповсюджені неінфекційні захворювання (ІХС, атеросклероз, цукровий діабет ІІ типу, ожиріння) пов'язують з порушенням імунного гомеостазу та розвитком системного запалення (СЗ) з уповільненим перебігом [2]. Провідну роль в ініціації прозапальних змін у осіб з надмірною масою тіла та ожирінням відводять підвищенню активності клітин фагоцитарного ряду – макрофагам і нейтрофілам. Активовані моноцити/макрофаги та деякі інші клітини (ендотеліоцити) модулюють запальний процес шляхом синтезу ряда прозапальних цитокінів – (ТНФ-α, ІЛ-1β, ІЛ-6), біологічна роль яких полягає в підвищенні імунного захисту: диференціюванні Т- і В-лімфоцитів, синтезі білків гострої фази, підсиленні гемопоезу, некрозі пухлинних клітин [12,13]. Макрофаги також беруть участь в обміні ліпідів: накопичують, перетравлюють і виділяють ліпіди в загальний кровообіг [3].

Важливе питання щодо участі фагоцитуючих клітин у реакції жирової тканини на висококалорійне харчування залишається відкритим.

Мета даного дослідження – вивчити прояви макрофагальної реакції жирової тканини при утриманні щурів на висококалорійному раціоні.

Об'єкт і методи дослідження

Дослідження проведені відповідно до принципів біоетики, законодавчих норм та положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Стразбург, 1986) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Експерименти виконані на 40 статевозрілих щурах-самцях, яких впродовж 9 тижнів утримували на висококалорійному раціоні, що включав 47% стандартного корму та додатково згущене молоко (44%), соняшникову олію (8%) та крохмаль (1%) [14]. У висококалорійній суміші вміст жирів був на 18,4%, вміст вуглеводів – на 17,2% більший та вміст білків – на 40% менший порівняно з стандартним кормом. Контрольна група щурів отримувала стандартний корм, дослідна група – висококалорійну суміш. Через 9 тижнів тварин дослідної і контрольної груп рандомізували та розподілили кожну на дві підгрупи, сформувавши наступні чотири підгрупи: перша – інтактні щури, які отримували стандартний корм, друга – іммобілізаційний стрес за методом Г.Селье [10] – п'ять сеансів щоденно по три години іммобілізації; третя – висококалорійне харчування; четверта підгрупа – висококалорійне харчування та іммобілізаційний стрес.

Після моделювання іммобілізаційного стресу через одну добу тварин всіх підгруп забивали паралельно під тіопенталовим наркозом (внутрішньоочеревинно 40 мг/кг маси тіла). Для оцінки макрофагальної реакції відбирали шматочки епидидимальної жирової тканини, яка відзначається високою чутливістю до біологічної дії інсуліну. Отриманий матеріал фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну, потім піддавали парафіновій проводці, після чого виготовляли серійні зрізи товщиною 4-5Ч10^{-6} м. Препарати зафарбовували гематоксиліном і еозином, а також використовували PAS-реакцію по Мак-Манусу-Хочкису (контроль з амілазою). Гістологічні методики виконували згідно прописів, викладених в посібниках з гістологічної техніки і гістохімії [5,7]. Вивчення мікропрепаратів і фотографування проводили на мікроскопі «Olympus» BX-41 (Японія) при збільшенні на Ч200Ч400Ч1000. Морфометричним методом оцінювали загальну кількість макрофагів в одному полі зору (3,12Ч10^{-7}м). Цифрові дані обробляли методом варіаційної статистики за допомогою електронних таблиць «Exel-5». Статистичний аналіз результатів дослідження проводили за допомогою програми SPSS 17.0 для Windows методами варіаційної статистики. Для оцінки відмінностей між групами використовували тест Краскела-Уолліса. Критичний рівень значущості у дослідженнях приймали $\leq$ 0,05.

Результати досліджень та їх обговорення. Проведені дослідження показали, що у щурів, які отримували висококалорійний корм впродовж 9 тижнів, кількість макрофагальних клітин в епидидимальній жировій тканині в середньому в 4 рази перевищувала відповідний показник контрольної групи тварин **(табл.)**. Аналогічний характер кількісних змін макрофагів був виявлений у щурів під впливом іммобілізаційного стресу, але ці зміни були менш виражені. Найбільших значень підсилення макрофагальної реакції досягло при поєднаному впли-

ві висококалорійного харчового раціону та іммобілізаційного стресу **(табл.)**, перевищуючи в 5,5 раз показник контрольної групи (адипоцити жирової тканини крупні) **(рис. 1)**. Варто зазначити, що клітини макрофагального ряду в контрольній групі зустрічаються рідко і представлені поодинокими екземплярами. Адипоцити середніх розмірів, крупні клітини малочисленні **(рис. 2)**.

В другій групі досліджень у стресованих щурів макрофаги зустрічаються часто і представлені функціонально активними екземплярами **(рис 3)**.

В третій групі щурів, які отримували висококалорійний корм, макрофаги, як правило, розташовуються групами по 3-5 екземплярів. Адипоцити крупніші, чим в групі контролю, що характерно для гіпертрофічного типу ожиріння **(рис. 4)**.

Отримані нами результати експериментальних досліджень про розвиток макрофагальної реакції у щурів під впливом висококалорійного харчування, узгоджуються з результатами досліджень інших авторів, які в глютеальних біопсійних пунктатах у людей з ожирінням спостерігали акумуляцію макрофагів в білій жировій тканині, виникнення вогнищ хронічного запалення та розвиток метаболічних ускладнень [1].

Таблиця.

Кількість макрофагів в одному полі зору ($3,12x10^{-7}$ м²), екз. (M±m)

Групи	Кількість макрофагів в одному полі зору
Контроль	0,86±0,26
Іммобілізаційний стрес	2,86±0,26*^#
Висококалорійне харчування	3,86±0,34*
Висококалорійне харчування + іммобілізаційний стрес	4,71±0,29*■

Примітка: * – p<0,001 між дослідною і контрольною групами; ^ – p<0,05 між другою, третьою та четвертою групами; ■ – p>0,05 між другою та іншими дослідними групами (третьою, четвертою); # – p<0,001 між четвертою та іншими дослідними групами;

Виходячи з отриманих результатів, можна зробити висновок про те, що висококалорійний раціон ініціює розвиток макрофагальної реакції, а при сполученні зі стресом сприяє найбільш вираженій міграції макрофагів у жирову тканину, що є критерієм СЗ. Враховуючи статистично достовірну значимість відмінностей між другою (іммобілізаційний стрес) і третьою (висококалорійне харчування) групою досліджень та відсутність достовірних відмінностей між третьою і четвертою (сполучення висококалорійного харчування та іммобілізаційного стресу) групами досліджень, можна стверджувати, що провідну роль у активації макрофагальної реакції відіграє висококалорійний раціон, а іммобілізаційний стрес здійснює потенціюючий вплив.

Доведено, що при моделюванні аліментарного ожиріння у щурів спостерігається пригнічення активності макрофагів печінки, що сприяє гальмуванню клітинного імунітету [4]. Раніше нами доведено, що висококалорійне харчування у сполученні з імобілізаційним стресом у щурів супроводжується зниженням концентрації інсуліну в сироватці крові [11].

У моноцитах домінує аеробний шлях отримання енергії. Об'єктом фагоцитозу макрофагів є, перш за все, крупні часточки [8]. Скупчення моноцитів в процесі вираженої інфільтрації жирової тканини у щурів третьої та четвертої груп, які отримували висококалорійне харчування, відображає «атаку» макрофагами крупних адипоцитів з надлишком ліпідів. Можна припустити, що зниження секреції інсуліну за умов висококалорійного раціону гальмує аеробні енергозалежні процеси фагоцитозу макрофагальними елементами. Отже, імунна відповідь організму при надмірному висококалорійному харчуванні, вірогідно, є неповноцінною.

На фагоцитуючих клітинах виявлені різні типи адренорецепторів, зокрема, β_2-адренорецептори експресуються на макрофагах, а також на інших

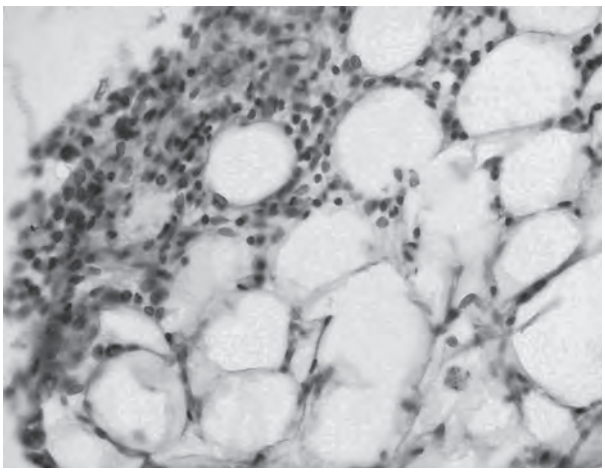

Рис. 1. Виражена інфільтрація жирової тканини макрофагами та лімфоцитами. Висококалорійне харчування + іммобілізаційний стрес. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Х400

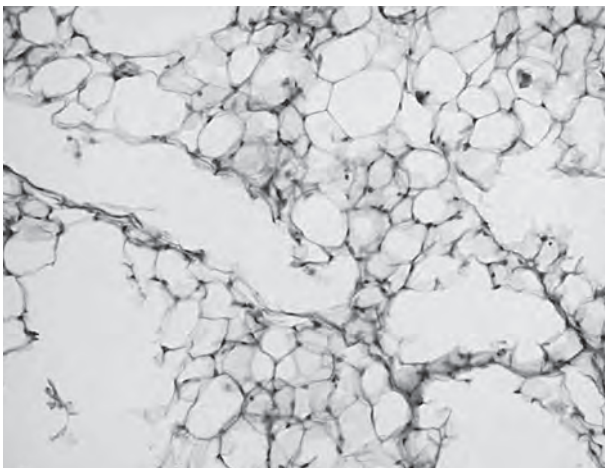

Рис. 2. Контроль. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Х200

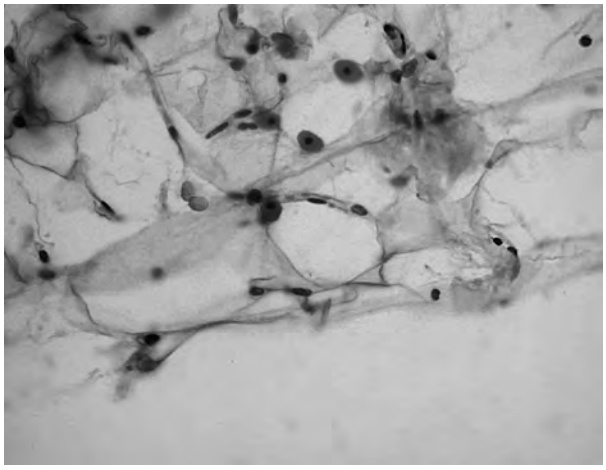

Рис 3. Гіпертрофія адипоцитів. Макрофаги багаточисленні, представлені крупними клітинними екземплярами. Стрес. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Х400

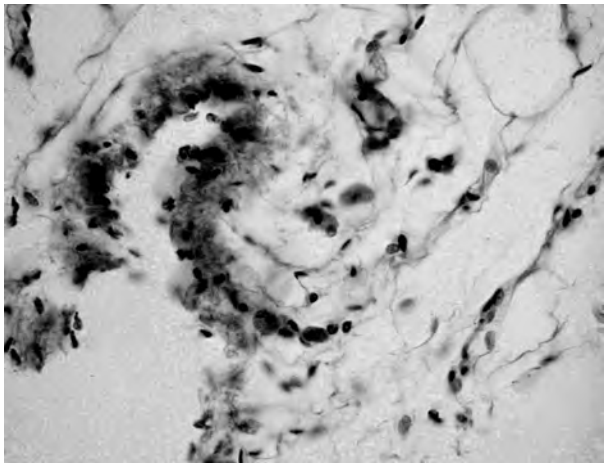

Рис. 4. Групи крупних макрофагів у жировій тканині. Ожиріння. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Х400

клітинах (еозинофіли, опасисті клітини) [9]. Це пояснює механізм активації макрофагальної реакції за умов іммобілізаційного стресу. Відомо, що відповідальну роль в реалізації стресорних функціональних і метаболічних змін відіграє активація симпатоадреналової системи [6].

Отже, стрес і висококалорійний раціон ініціюють прояви системного запалення за єдиним механізмом – шляхом стимуляції макрофагальної інфільтрації, яка зумовлює послідовність імунних реакцій: активацію продукції прозапальних цитокінів та підвищення синтезу білків гострої фази запалення.

Висновки

1. Висококалорійне харчування ініціює розвиток макрофагальної реакції жирової тканини у щурів.
2. Стресогенний вплив сприяє підсиленню макрофагальної реакції жирової тканини.

Перспективи подальших досліджень

Подальші дослідження динаміки розвитку макрофагальної реакції залежно від тривалості висококалорійного харчування та тяжкості емоційного стресу.

Література

1. Гогиашвили Л. Е. Макрофаги: ультраструктура и функции в жировой ткани и периферической крови у лиц с избыточной массой тела / Л. Е. Гогиашвили, З. Г. Цагарели, Е. Г. Никобадзе и др. // Аллергология и иммунология – 2010. – Т. 11, №2. – С. 119-120
2. Гусев Е. Ю. Системное воспаление: теоретические и методологические подходы к описанию модели общепатологического процесса. Часть 3. Предпосылки к описанию несиндромального подхода / Е. Ю. Гусев, В. А. Черешнев // Пат. физиол. и эксперим. тер. – 2013. – №3. – С.3-14.
3. Карр Я. Макрофаг. Обзор ультраструктуры и функции / Я. Карр – М. : Медицина, 1978. – 189 с.
4. Курганова И. В. Показатели липидного и белкового обмена крови и состояние клеток печени при экспериментальном ожирении: автореф. дис. на соискание ученой степени кандидата мед. наук: спец. 14.00.16 / И. В. Курганова – НИИ биохимии СО РАМН (Новосибирск). – Новосибирск, 2002. – 16 с.
5. Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лили – М. : Мир, 1960. – 648 с.
6. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца / Ф.З. Меерсон- М.: Медицина, 1984. – 269 с.
7. Меркулов Г. А. Курс патологогистологической техники / Г. А. Меркулов- М.: Медицина, 1961. – 339 с.
8. Мусил Я. Основы биохимии патологических процессов / Я. Мусил – М.: Медицина, 1985. – 430 с.
9. Орлова Е. Г. Молекулярные механизмы адренергического контроля функций фагоцитирующих клеток / Е. Г. Орлова, С. В. Шергиев // Успехи современной биологии. – 2004. – Т. 124, №4. – С. 342-353.
10. Селье Г. Очерки об адаптационным синдроме / Г. Селье – М.: Медицина, 1960. – 254 с.
11. Тарасенко Л. М. Вплив висококалорійної змішаної дієти на виразкове ушкодження шлунка та інкреторну функцію підшлункової залози за умов іммобілізаційного стресу в щурів / Л. М. Тарасенко, О. Є. Омельченко, В. Ю. Цубер [та ін.] // Медична хімія. – 2014. – Т.16. – №3 (60). – С.46-49.
12. Шварц В. В. Воспаление жировой ткани. Часть 6. Действие медикаментозных средств / В. В. Шварц // Проблемы эндокринологии – 2012. – №1. – С. 67-73.
13. Akira S. Interleukin-6 in biology and medicine/ S. Akira, T. Taga, T. Kishimoto // Adv. Immunol. – 1993. – Vol. 54. – P. 1-78.
14. West D. B. Dietary obesity in nine inbred mouse strains / D. B. West, C. N. Boozer, D. L. Moody et al. // Am. J. Physiol. – 1992. – № 262. – P. 1025-1032.

УДК: 616-002-092.9:613.22+613.86

МАКРОФАГАЛЬНА РЕАКЦІЯ ЯК МАРКЕР СИСТЕМНОГО ЗАПАЛЕННЯ ПРИ ВИСОКОКАЛОРІЙНОМУ ХАРЧУВАННІ ТА ІММОБІЛІЗАЦІЙНОМУ СТРЕСІ У ЩУРІВ

Тарасенко Л. М., Білець М. В., Омельченко О. Є., Цубер В. Ю., Горголь Н. І.

Резюме. Мета даного дослідження – вивчити прояви макрофагальної реакції жирової тканини при утриманні щурів на висококалорійному раціоні. Проведені дослідження показали, що у щурів, які отримували висококалорійний корм впродовж 9 тижнів, кількість макрофагальних клітин в епидидимальній жировій тканині в середньому в 4 рази перевищувала відповідний показник контрольної групи тварин. Аналогічний характер кількісних змін макрофагів був виявлений у щурів під впливом іммобілізаційного стресу, але ці зміни були менш виражені. Найбільших значень підсилення макрофагальної реакції досягло при поєднаному впливі висококалорійного харчового раціону та іммобілізаційного стресу, перевищуючи в 5,5 раз показник контрольної групи. Висококалорійне харчування ініціює розвиток макрофагальної реакції жирової тканини у щурів, а стресогенний вплив сприяє її підсиленню. Розвиток макрофагальної реакції є спільним патогенетичним механізмом висококалорійного харчування та стресу.

Ключові слова: висококалорійна дієта, іммобілізаційний стрес, макрофагальна реакція, системне запалення.

УДК: 616-002-092.9:613.22+613.86

МАКРОФАГАЛЬНАЯ РЕАКЦИЯ КАК МАРКЕР СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ВЫСОКОКАЛОРИЙНОМ ПИТАНИИ И ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ У КРЫС

Тарасенко Л. М., Билец М. В., Омельченко О. Е., Цубер В. Ю., Горголь Н. И.

Резюме. Цель данного исследования – изучить проявления макрофагальной реакции жировой ткани при содержании крыс на высококалорийном рационе. Установлено, что у крыс, которые получали высококалорийный корм на протяжении 9 недель, количество макрофагальных клеток в эпидидимальной жировой ткани в среднем в 4 раза превышало соответствующий показатель контрольной группы. Аналогичный характер количественных изменений макрофагов наблюдался при иммобилизационном стрессе у крыс, хотя и был меньше выраженным. Наибольших значений усиление макрофагальной реакции достигало при сочетанном влиянии высококалорийного рациона и иммобилизационного стресса, превышая в 5,5 раза показатель контрольной группы. Высококалорийное питание инициирует развитие макрофагальной реакции жировой ткани у крыс, а стрессогенное влияние способствует ее усилению. Развитие макрофагальной реакции является общим патогенетическим механизмом высококалорийного питания и стресса.

Ключевые слова: высококалорийная диета, иммобилизационный стресс, макрофагальная реакция, системное воспаление.

UDC: 616-002-092.9:613.22+613.86

MACROPHAGE REACTION AS A MARKER OF SYSTEMIC INFLAMMATION AT HIGH CALORIE DIET AND IMMOBILIZATION STRESS IN RATS

Tarasenko L. M., Bylets M. V., Omelchenko O. Y., Tsuber V. Y., Gorgol N. I.

Abstract. Although pathogenesis of obesity has not been not clearly defined, there is a lot of evidence that one of the mechanisms of its development is sustained and prolonged systemic inflammation. An increased activity of macrophages and neutrophils is believed to have a leading role in an initiation of inflammatory alterations in overweight or obese individuals. Participation of the phagocytes in adipose tissue response to high calorie diet is not investigated.

The aim of the present study was to investigate macrophage reaction at a high calorie diet. Experiments were performed on 40 adult male rats which were fed a high calorie diet for 9 weeks. The diet consisted of standard feed (47%), condensed milk (44%), sunflower oil (8%) and starch (1%). The amount of fat was 18.4% bigger than in the standard feed, while carbohydrate content was 17.2% bigger and protein content was 40% smaller. The control group received a standard rat feed. After 9 weeks the animals in both groups were randomized, each group was divided into two subgroups. The resulting four groups were as follows: in the first group there were intact rats who received a standard feed, the animals in the second group were subjected to an immobilization stress after Selye – five daily sessions of three-hour immobilization; the animals in the third group were fed a high calorie diet; the fourth group was both fed a high calorie diet and subjected to an immobilization stress. Epydydymal adipose tissue was used to assess the macrophage reaction. The tissue is characterized by high sensitivity to biological effects of insulin. The obtained material was fixed in 10% neutral formalin solution, embedded in paraffin and sectioned. The resulting samples were 4-5Ч10^{-6} m thick. The preparations were stained with hematoxylin and eosin. PAS-reaction (amylase controlled) was also used. Histological techniques were performed in accordance to formulations described in manuals of histological techniques and histochemistry. An «Olympus» BX-41 microscope (Japan) was used to study and photograph the micropreparations at magnification Ч200Ч400Ч1000. A number of macrophages in a field of vision (3,12Ч10^{-7}m) was assessed morphometrically. Microsoft Excel 5 was applied to analyze the obtained data with methods of variation statistics. Statistical analysis of the results was performed with SPSS 17.0 for Windows using methods of variation statistics. Kruskal-Wallis test was applied to assess differences between groups. The critical level of significance was $\leq$ 0,05.

The prolonged high calorie diet led in average to a fourfold increase in macrophage cells in epydydymal adipose tissue compared to that in the animals in the control group (3,86 ± 0,34 macrophages in a field of vision versus 0,86 ± 0,26, $p<0.001$). A similar pattern was observed in the rats subjected to immobilization stress combined with high calorie diet (2,86 ± 0,26 macrophages in a field of vision, $p<0.001$), but its severity was smaller compared to the macrophage reaction in the group of non-stressed rats that were fed high calorie diet ($p<0.05$). The combination of high calorie diet and immobilization stress caused the most pronounced adipose macrophage reaction: the number of cells in a field of vision was 4,71 ± 0,29 ($p<0.001$).

Thus, high calorie diet triggers development of the adipose macrophage reaction in rats, and effect of stressors contributes to its aggravation. Development of the macrophage reaction is a common pathogenetic mechanism of high calorie diet and stress.

Keywords: high calorie diet, immobilization stress, macrophagal reaction, systemic inflammation.

Рецензент – проф. Старченко В. О.

Стаття надійшла 01.10.2015 р.