

УДК 611.127:615.212.7] – 018 – 019

П. Б. Покотило

Львівський національний медичний університет ім. Д. Галицького, м. Львів

ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПЕРЕДСЕРДЬ БІЛОГО ЩУРА ПІД ДІЄЮ ОПІОЇДІВ

В роботі представлено результати імуногістохімічного дослідження передсердь білих щурів на ранніх термінах експериментальної 6 тижневої моделі опіоїдної інтоксикації на 60 статевозрілих щурах-самцях віком 4,5-5 місяців, яким протягом 6 тижнів вводили опіоїдний анальгетик "Налбуфін" з розрахунку 8 мг/кг маси тіла на 1 тижні експерименту, 15 мг/кг на 2 тижні експерименту зі збільшенням дози на 6 тижні експерименту до 35 мг/кг. Імуногістохімічне дослідження зразків проводилося в Jeff Wana's laboratory, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, 600 University Ave Toronto з використанням антитіл, до μ -опіоїдного рецептора, Caspase-3 (апоптоз) та Phospho-Histone H3 (проліферативні процеси). При дослідженні встановлено, що μ -опіоїдний рецептор локалізується на сарколемі кардіоміоцитів. Збільшення його кількості спостерігається починаючи з 7 доби експерименту. Опіоїдний анальгетик "Налбуфін" вже на 7 добу експерименту викликає явища апоптозу, які на більш віддалених термінах експерименту продовжують наростати. Проліферативні процеси спостерігаються в ділянці епікарду передсердя щура спершу в стінках судин, а згодом їхніх периваскулярних просторах. Дані процеси нарастають до 14 доби та продовжують наростати на більш пізніх термінах опіоїдної інтоксикації.

Ключові слова: імуногістохімія, серце щура, опіоїдний анальгетик, апоптоз, μ -опіоїдний рецептор.

Робота є фрагментом НДР « Структура органів та їх кровоносного русла в онтогенезі під дією лазерного опромінення та фармацевтичних засобів при порушенні кровопостачання, реконструктивних операціях та цукровому діабеті». Номер державної реєстрації: 0110U001854.

Невпинне зростання в Україні та у світі наркозалежних осіб набуло характеру епідемії, що зумовило низку нових соціальних, економічних, медичних та юридичних проблем [5, 7]. Особливу увагу привертає факт значного омолодження наркозалежних осіб. За даними UNODC при ООН число наркозалежних осіб у 2012 році склало від 182 до 324 млн. осіб, у віці від 16 до 64 років [1, 3, 6]. Важливим є питання щодо використання опіоїдів в клінічній практиці, зокрема при лікуванні хронічного болю в онкохворих, постопераційного болю та використання опіоїдів в комбінованих препаратах, оскільки в силі знеболювальної дії з опіоїдами можуть позмагатись небагато препаратів і перспективність їх використання неможливо недооцінювати. Морфологічні зміни органів наркоспоживачів описані [2, 4], як на мікро-, так і на ультраструктурному рівні, однак залишаються незрозумілими питання, які зміни в органах викликають саме опіоїди, оскільки багато дослідників пов'язують зміни у внутрішніх органах наркоманів зі способом життя та супутніми токсичними речовинами, які часто утворюються внаслідок кустарного виготовлення наркоречовини. Експериментальні ж дослідження в цьому напрямку фактично не проводились.

Метою роботи було дослідження передсердь білих щурів на світлооптичному рівні з використанням імуногістохімічних зразків, з відтворенням експериментальної 6 тижневої моделі опіоїдної інтоксикації.

Матеріал та методи дослідження. Для експериментального дослідження використано 60 статевозрілих білих щурів самців масою 180-200г, віком 4,5-5 місяців, що були розподілені на 3 групи. Перша група – експериментальна (по 5 тварин на 1 та 2 тижнях експерименту та наступних тижнях експерименту), разом 30 тварин. Тваринам вводили дом'язово опіоїдний анальгетик "Налбуфін" з розрахунку 8мг/кг маси тіла на 1 тижні експерименту, та 15 мг/кг на 2 тижні, з поступовим зростанням дози на 6 тижні до 35мг/кг маси тіла. Друга група – контрольна: 18 тварин (по 3 тварини на кожен тиждень експерименту). Тваринам вводили дом'язово стерильний 0,9% розчин NaCl в об'ємі 1мл. Третя група – 12 інтактних тварини відповідної статі, віку та маси.

Опіоїдний анальгетик "Налбуфін" за хімічною структурою (-)-17-(cyclobutylmethyl)-4,5 α -ерохуморфінан-3,6 α ,14-triol hydrochloride близький до морфіну. Крім фармакологічної дії пов'язаної з тим, що він є агоністом-антагоністом опіатних рецепторів і відповідно має анальгезуючу дію, яка має зв'язок з агоністичним впливом на κ -рецептори, але й разом з тим сполука є антагоністом μ -рецепторів, тому в неї відсутня виражена ейфорична дія.

Всі тварини містились в умовах віварію на звичайному харчовому раціоні. Робота проводилась згідно "Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин"(1977р.), Конвенцією Ради Європи "Про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та інших наукових цілях"(1986р.), Директиви ЄЕС 3609(1986р.) та наказу МОЗ України №281 від 01.11.2000 р. "Про міри по подальшому вдосконаленню організаційних норм роботи з використанням експериментальних тварин", "Загальними етичними правилами

експериментів на тваринах”, ухваленими I Національним конгресом з біоетики від 20 вересня 2001 року, м. Київ, Закону України “Про захист тварин від жорстокого поводження” №3446 – IV від 21.02.2006 р. При виконанні роботи проводилися заходи по дотриманню принципів етики для проведення біомедичних досліджень. Протокол комісії по біоетиці Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького №2 від 20 лютого 2012 року. Забір матеріалу для імуногістохімічного дослідження здійснювали після евтаназії щурів шляхом внутрішньо-очеревинного введення тіопенталу натрію з розрахунку 25 мг на 1кг маси тіла. У якості матеріалу для імуногістохімічних досліджень використовували стінку правого передсердя.

Результати дослідження та їх обговорення. Імуногістохімічне дослідження зразків проводилося в Jeff Wrana's laboratory, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, 600 University Ave Toronto, за рахунок її повного фінансового та матеріально-технічного забезпечення, з використанням 3 видів антитіл, зокрема до μ -опіоїдного рецептора, Caspase-3 (апоптоз) та Phospho-Histone H3 (проліферативні процеси).

На препаратах, що були пофарбовані з використанням антитіл до μ -опіоїдного рецептора згідно отриманих результатів дослідження можна зробити висновок про локалізацію на сарколемі кардіоміоцитів μ -опіоїдного рецептора в нормі (рис. 1 в) та контролі (рис. 1 а). На 7-му добу експерименту спостерігається його збільшення на сарколемі вдвічі у порівнянні з контролем та нормою та незначна його кількість у просвіті кардіоміоцитів (рис. 1с). На 14 добу – кількість μ -опіоїдного рецептора збільшується в 3-4 рази в порівнянні з нормою та контролем (рис. 1d).

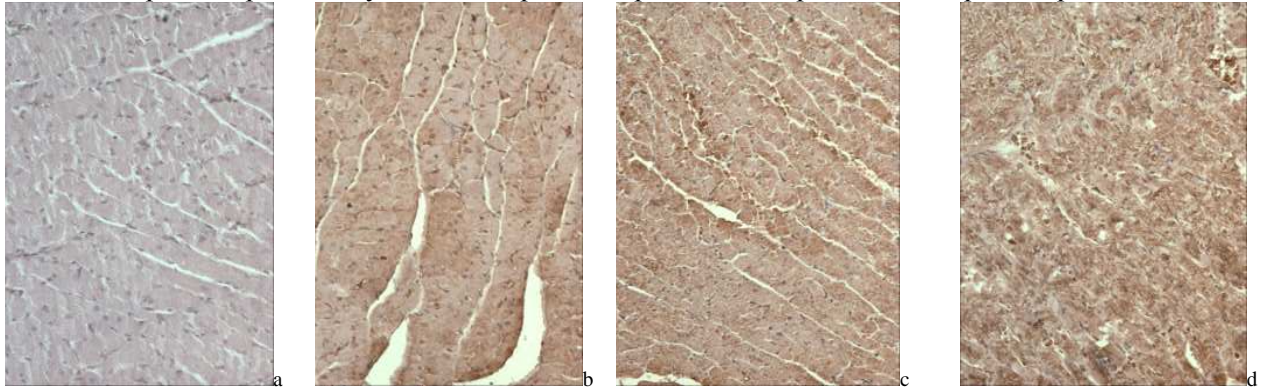


Рис. 1. Імуногістохімія серця щура з використанням антитіл до μ -опіоїдного рецептора. а – контроль, б – норма, с – 7 доба, д – 14 доба експерименту. Збільшення: $\times 400$.

На препаратах з Caspase-3 в інтактних та в контрольних тварин спостерігаються поодинокі кардіоміоцити з ознаками апоптозу (рис. 2 а, б). Явища апоптозу наростають починаючи з 7-доби експерименту в ділянці епікарду та периваскулярних просторів. З 14 доби експерименту спостерігаються апоптичні зміни в кардіоміоцитах міокарду передсердь, що досягають свого максимуму на 21-добу експерименту. На 7-му добу експерименту спостерігається більш виражені зміни в ділянці епікарду, що свідчить про апоптичні процеси в епікарді у порівнянні з контрольними зразками (рис. 2с). На 14-ту добу експерименту наростає інтенсивність забарвлення в периваскулярних ділянках. На 14-ту добу експерименту спостерігається зростання інтенсивності фарбування у міокарді, що може свідчити про прискорення апоптичних змін кардіоміоцитів (рис. 1 d).

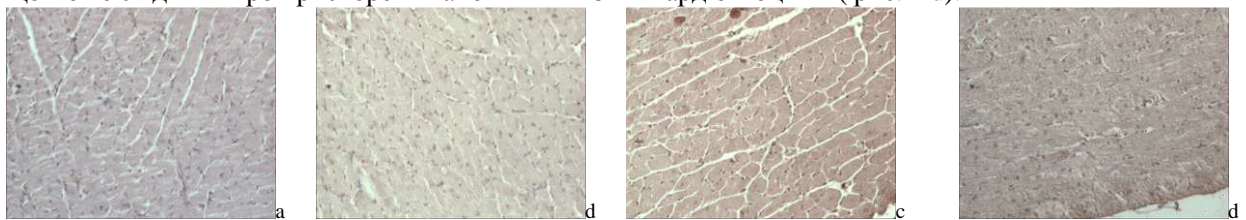


Рис. 2. Імуногістохімія серця з використанням активованої Caspase-3. а – контроль, в – норма, с – 7 доба експерименту, д – 14 доба експерименту. Збільшення: $\times 400$.

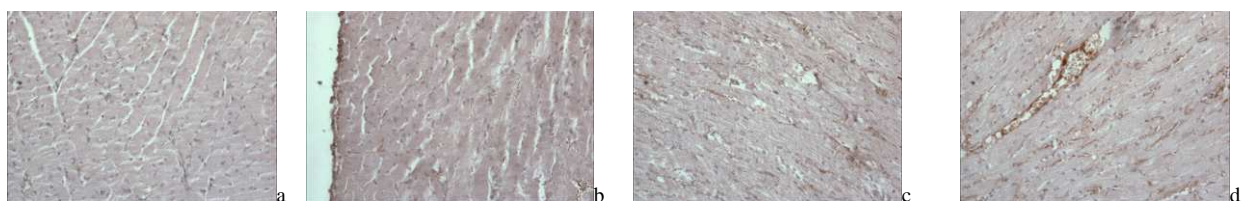


Рис. 3. Імуногістохімія серця з використанням Phospho-Histone H3 а – контроль, в – норма, с – 7 доба експерименту, д – 14 доба експерименту. Збільшення: $\times 400$.

На препаратах з Phospho-Histone H3 спостерігається незначна проліферація в групах контрольних (рис. 3а) та інтактних тварин (рис. 3 в) в периваскулярних ділянках та в епікарді. На препаратах отриманих на 7-му (рис. 3 с) та 14 добу (рис. 3 d) експерименту спостерігається підвищення проліферації в периваскулярних ділянках, стінках судин та незначна проліферація в ділянці епікарду. Ознак проліферації міокарду та ендокарду нами не виявлено.

Висновки

1. Згідно отриманих результатів дослідження μ -опіоїдний рецептор локалізується на сарколемі кардіоміоцитів, та починаючи з 7 доби експерименту зростає його кількість.
2. Опіоїдний анальгетик "Налбуфін" на 7 добу експерименту викликає явища апоптозу, які на більш віддалених термінах експерименту прискорюються.
3. Проліферативні процеси спостерігаються в передсерді щура спершу в стінках судин, а згодом в їхніх периваскулярних просторах в ділянці епікарду. Дані процеси наростають до 14 доби та продовжуються на більш пізніх термінах опіоїдної інтоксикації.

Перспективи подальших досліджень передбачають проведення імуногістохімічного дослідження на більш пізніх термінах опіоїдної інтоксикації з метою поглибленого вивчення динаміки морфологічних змін у передсердях білого щура.

Список літератури

1. Вієвський А. М. Національний звіт щодо наркотичної ситуації (дані 2010 року) для Європейського моніторингового центру з наркотиків та наркотичної залежності. Україна. Тенденції розвитку, поглиблений огляд з обраних тем" / А. М. Вієвський, М. П. Жданова, С. В. Сидяк [та ін.] // - Київ, - 2011, 96 с.
2. Маянский Н. А. Состояние каспазы-3 при подавлении апоптоза нейтрофилов гранулоцитарно - макрофагальным колониестимулирующим фактором / Н. А. Маянский // Иммунология. – 2001. – №2. – С.22–25.
3. Шаповалов В. В. Судова фармація: режим контролю наркотичних засобів для фармакокорекції наркопацієнтів з девіантною поведінкою / В.В.Шаповалов //Український вісник психоневрології. – 2011.-Том 19, №2(67). – С. 97-101.
4. Abbasi A. Opioid receptors blockade modulates apoptosis in a rat model of cirrhotic cardiomyopathy / A. Abbasi, A. Joharimoqaddam, N. Faramarzi [et al.] // - Ann Med Health Sci Res - 2014, Vol.4, P. 404-409.
5. Jonathan C. "The global recession's effect on drug demand - diluted by inertia" / C. Jonathan // - International Journal of Drug Policy, vol. 22, No. 5, September - 2011, P. 374-375.
6. United Nations Office on Drugs and Crime, World Drug Report - 2014, / United Nations publication, Sales No. E.14.XI.7.
7. Zuccato E. "Changes in illicit drug consumption patterns in 2009 detected by wastewater analysis" / E. Zuccato // - Drug Alcohol Depend, vol. 118, Nos. 2 and 3, November - 2011, P. 464-469.

Реферати

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРДСЕРДИЙ БЕЛОЙ КРЫСЫ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ОПИОИДОВ

Покотило П. Б.

В работе представлены результаты иммуногистохимического исследования предсердий белых крыс на ранних сроках экспериментальной 6 недельной модели опиоидной интоксикации на 60 половозрелых крысах-самцах в возрасте 4,5-5 месяцев, которым на протяжении 6 недель внутримышечно вводили опиоидный анальгетик "Налбуфин" из расчета 8 мг/кг массы тела на 1 неделе эксперимента, 15 мг/кг на 2 неделе эксперимента с увеличением дозы на 6 неделе эксперимента до 35 мг/кг. Иммуногистохимическое исследование производилось в Jeff Wrana's laboratory, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, 600 University Ave Toronto, с использованием антител к μ -опиоидному рецептору, активированой Caspase-3(апоптоз) и Phospho-Histone H3(пролиферативные процессы). При исследовании установлено, что μ -опиоидный рецептор размещается на сарколемме кардиомиоцитов. Увеличение его количества наблюдается начиная с 7 суток эксперимента. Опиоидный анальгетик "Налбуфин" уже на 7 сутки эксперимента вызывает апоптоз, который на более поздних сроках эксперимента продолжает увеличиваться. Проліферативные процессы сначала наблюдаются в стенках сосудов, позже в их периваскулярных пространствах в области епікарда. Данные процессы продолжают нарастать на более поздних сроках эксперимента.

Ключевые слова: иммуногистохимия, сердце крысы, опиоидный анальгетик, апоптоз, μ -опиоидный рецептор.

Статья надійшла 3.10.2014 р.

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF WHITE RAT ATRIUM AFTER THE EFFECT OF OPIOID INTOXICATION

Pokotylo P. B.

The results of immunohistochemical study of atrial white rats in the early stages of the experimental 6-week model of opioid intoxication on 60 sexually mature male rats at the age of 4.5-5 months, which for 6 weeks intramuscularly administered opioid analgetik "Nalbufin" calculation of 8 mg / kg body once a week experiment 15 mg / kg at week 2 of the experiment with increasing dose at week 6 of the experiment to 35 mg / kg. Immunohistochemical examination was carried out in Jeff Wrana's laboratory, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, 600 University Ave Toronto, using antibodies to μ -opioid receptor activation Caspase-3 (apoptosis) and Phospho-Histone H3 (proliferative processes). In the study found that the μ -opioid receptor located on sarkoleme cardiomyocytes. Increasing the amount thereof is observed starting from 7 days of the experiment. Opioid analgetik "Nalbufin" already on the 7th day of the experiment causes apoptosis, which in the later stages of the experiment continues to increase. Proliferative processes were first observed in the vessel walls, and later in their perivascular spaces in epikarda. These processes continues to increase at Bol later stages of the experiment.

Key words: immunohistochemistry, rat heart, opioid analgetics, apoptosis, μ -opioid receptors.

Рецензент Єрошенко Г.А.