

Экспериментальные статьи

ТЮРЕНКОВ И. Н., ВОРОНКОВ А. В.,
ПЕТРОВА Е. В., СЛИЕЦАНС А. А.,
РОБЕРТУС А. И., ВОЛОТОВА Е. В.

Сравнительная оценка вазодилатирующей функции эндотелия при патологиях различного генеза

Волгоградский государственный медицинский университет

e-mail: Ali-as@yandex.ru

Реферат

Проведена сравнительная оценка степени эндотелиальной дисфункции (ЭД) при различных экспериментальных патологиях: экспериментальный сахарный диабет, экспериментально-вызванная недостаточность половых гормонов и иммобилизационно-болевого стресс. Степень ЭД оценивалась доплерографическим методом по изменению эндотелиозависимой вазодилатации (ЭЗВД) при модификации синтеза оксида азота. Наиболее выраженная ЭД наблюдается при экспериментальном сахарном диабете (СД), незначительно меньше — при экспериментальной недостаточности половых гормонов (ЭНПГ). При иммобилизационно-болевым стрессе регистрируется отчетливое снижение ЭЗВД, но менее выраженное, чем при ЭСД и ЭНПГ.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция, эндотелиозависимая вазодилатация, экспериментальный сахарный диабет, экспериментальная недостаточность половых гормонов, иммобилизационно-болевого стресс.

Tyurenkov I. N., Voronkov A. V., Petrova E. V., Slietsans A. A.,
Robertus A. I., Volotova E. V.

Comparative evaluation of vasodilating endothelial function in pathologies of various origins

The Volgograd State Medical University

e-mail: Ali-as@yandex.ru

Abstract

This article considers the comparative assessment of the degree of endothelial dysfunction (ED) under various experimental pathology: experimental diabetes, experimentally-induced failure of sex hormones and immobilization-pain stress. Degree of ED was assessed by Doppler Change endotheliumdependent vasodilation (EDVD) in the modification of NO synthesis. The most pronounced ED is observed in experimental diabetes mellitus (DM), slightly less - in experimental deficiency of sex hormones (ENPG). Immobilization-pain stress detected distinct reduction EDVD, but less pronounced than in ESD and ENPG.

Keywords: endothelial dysfunction, endothelium-dependent vasodilatation, an experimental diabetes, experimentally-induced failure of sex hormones, immobilization-pain stress.

Введение

По современным научным представлениям, дисфункция эндотелия является триггерным механизмом формирования кардиоваскулярных осложнений при сахарном диабете, гормональном дисбалансе, остром и хроническом стрессе и т. д. [4, 6, 19]. Исходя из этого, при изучении эндотелиотропных эффектов фармакологических средств в эксперименте представляется важным использовать валидные модели воспроизведения ЭД.

Одним из наиболее ранних проявлений ЭД является нарушение эндотелиозависимой вазодилатации и, как следствие этого, сосудистого тонуса [18]. Для воспроизведения ЭД в эксперименте могут использоваться различные модели: экспериментальный сахарный диабет (ЭСД), экспериментально вызванная недостаточность половых гормонов (ЭНПГ), стресс, введение асимметричного диметиларгинина (ADMA), блокаторов эндотелиальной NO-синтазы и др.

Однако для выбора модели ЭД, адекватной поставленным задачам, необходим сравнительный анализ степени выраженности нарушений эндотелия при патологиях различного генеза. В данной работе изучена вазодилатирующая функция эндотелия при эндокринных патологиях различного генеза: при ЭСД и ЭНПГ, а также при стрессорном воздействии.

Материал и методы исследования

Исследование выполнено на 80 беспородных крысах, разделенных на 5 групп:

- 1 группа — интактные крысы;
- 2 группа — ложнооперированные крысы-самки (группа ЛО);
- 3 группа — крысы с экспериментально вызванным СД (группа ЭСД);
- 4 группа — крысы с экстирпацией матки с придатками (группа ЭНПГ);

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

5 группа — стрессированные животные (группа СЖ).

Сахарный диабет вызывался в/в введением стрептозотоцина в дозе 45 мг/кг [7]. О развитии СД судили по степени гликемии на 3-и сутки [3]. Уровень гликемии определяли в плазме крови спектрофотометрически глюкозооксидазным методом с использованием набора «Глюкоза-ФКД». Моделирование ЭНПГ проводилось путем экстирпации матки с придатками. О развитии гормональной недостаточности судили по изменению уровня половых гормонов (снижение уровня эстрогена и повышение фолликулостимулирующего гормона (ФСГ)) с помощью иммуноферментного анализа с дополнительным цитологическим подтверждением стадии полового цикла у самок [9].

В качестве группы положительного контроля для крыс с ЭНПГ использовали ложнооперированных животных, которым проводили все хирургические манипуляции, кроме экстирпации матки с придатками. Эмоционально-болевое стрессирование осуществляли подвешиванием животных за дорсальную кожную складку шеи с помощью специальных зажимов Кохера на расстоянии 1,5 м от пола длительностью 24 часа. Состояние стресса у животных определяли морфосоматически по уменьшению относительной массы органов тимико-лимфатической системы (тимуса и селезенки) и степени изъязвления слизистой оболочки желудка. Оценку развития ЭД проводили на 28-е сутки после введения стрептозотоцина или кастрации животных и через 30–60 минут после прекращения воздействия стрессорных факторов.

Сравнительную оценку ЭД проводили с помощью функционального подхода, заключающегося в оценке степени эндотелиозависимой вазодилатации (ЭЗВД) по увеличению скорости мозгового кровотока (СМК) в ответ на введение модификаторов синтеза эндогенного оксида азота (ацетилхолин (АЦХ) в дозе 0,01 мг/кг (*Acros organics*, США), L-аргинин в дозе 300 мг/кг (*Acros organics*, США) и сужению сосудов (падению СМК) после введения блокатора eNOS-нитро-L-аргинина (N-L-A) (*Acros organics*, США) в дозе 10 мг/кг. Эндотелионезависимая вазодилатация (ЭНВД) оценивалась по СМК на фоне введения экзогенного донатора оксида азота нитроглицерина (НТГ) (0,007 мг/кг) (МТХ, Москва). Сопоставляя выраженность ЭЗВД при введении АЦХ, сужения сосудов при введении N-L-A и выраженность «L-аргининового

парадокса» у животных интактной и ЛО групп и у животных с экспериментальной патологией, судили о степени ЭД. СМК регистрировали в проекции среднемозговой артерии через трепанационное отверстие диаметром 0,3 см с использованием ультразвукового доплерографа, датчика с рабочей частотой 25 МГц и рабочей компьютерной программы ММ-Д-К-Minimax Doppler v.1.9. (Санкт-Петербург, Россия) [8].

Выраженность ЭЗВД также можно оценить по индексу ЭД, рассчитанному по формуле:

$$\text{ЭД} = [1 - \text{ЭЗВД} / \text{ЭНЗВД}].$$

Индекс ЭД является относительной величиной, которая зависит от дозы вводимых анализаторов (ацетилхолина, нитроглицерина). Для корректных и достоверных расчетов в нашей работе дозы анализаторов для оценки как ЭЗВД (ацетилхолин), так и ЭНВД (нитроглицерин), были всегда постоянны и подобраны таким образом, чтобы вызывать максимальную вазодилатацию. В этом случае по соотношению ЭЗВД к ЭНВД можно судить о выраженности ЭД, т. е. чем результат ближе к 1, тем выше степень развития ЭД.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием непараметрического критерия множественных сравнений Крускала–Уоллиса и Дана с использованием компьютерной программы BioStat 2008. Данные принимались статистически достоверными при $\alpha < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Группа животных с экспериментальным сахарным диабетом формировалась путем отбора крыс с уровнем гликемии 12 мм/л и выше. В группе животных, которым была проведена операция по удалению матки с придатками, концентрация эстрадиола снизилась в 3,27 раза по сравнению с показателем в группе ЛО животных (рис. 1). Уровень ФСГ в группе животных с ЭНПГ находится в диапазоне, характеризующем состояние постменопаузы, для которого характерно повышенное содержание ФСГ (25,8–134,8 мМЕ/мл).

При изучении влияния стрессорных факторов на морфосоматические изменения органов тимико-лимфатического аппарата получены результаты, представленные в табл. 1.

Представленные данные позволяют говорить о существенных дезадаптационных процессах в организме животных и развитии ЭНПГ, ЭСД и стресса при

Выраженность морфосоматических изменений у животных в условиях острого иммобилизационно-болевого стресса

Таблица 1

Группа	Относительная масса органов (мг/100г веса животного) (M±m)			Степень язвенного поражения слизистой оболочки желудка
	надпочечники	селезенка	тимус	
Интактная (n=7)	13,05±0,81	381,34±29,37	86,9±12,13	0,28±0,18
Стрессированные (n=7)	17,66±1,07*	210,46±16,27*	55,58±7,99*	2,55±0,24*

* — достоверно по отношению к группе интактных животных ($\alpha \leq 0,05$). Критерий U Мана–Уитни.

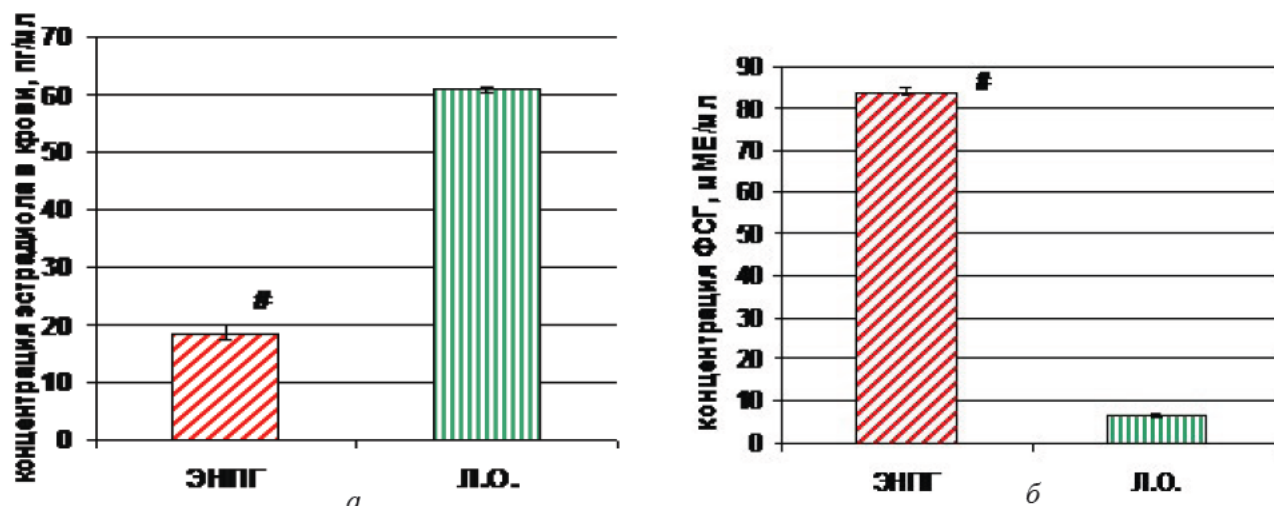


Рис. 1. Концентрация эстрадиола (а) и ФСГ (б) в исследуемых группах: ЛО — ложнооперированные животные; ЭНПГ — животные с экспериментально вызванной недостаточностью половых гормонов; # — различия статистически значимы по сравнению с группой ЛО животных ($p < 0,05$, непараметрический U критерий Манна–Уитни)

данных методических подходах. Суммированные данные о вазодилатирующей функции эндотелия животных с ЭСД, ЭНПГ и СЖ приведены в табл.2. Стоит отметить, что вазодилатирующая функция эндотелия в основном обусловлена как базальной, так и стимулированной выработкой оксида азота. Предложенный нами подход к оценке ЭД дает возможность оценить не только вазодилатирующую функцию эндотелия как в норме, так и при патологии, но и дать сравнительную оценку эндотелиальным нарушениям различного генеза. У животных с ЭСД исходная СМК была значительно меньше в сравнении с показателями интактной группы. У животных с ЭНПГ и СЖ исходный уровень СМК был меньше, чем у ЛО и интактной группы, но выше, чем у животных с ЭСД.

Кроме того, изначально меньшая СМК у группы животных с ЭСД и в меньшей степени у СЖ и крыс с ЭНПГ может свидетельствовать о нарушении функ-

ционирования системы синтеза и высвобождения базального NO [10, 17].

Для оценки вазодилатирующей функции эндотелия и «нарушения» синтеза и выделения базального NO может служить тест с введением N-L-A. Опираясь на собственные исследования и данные других авторов, можно предположить, что чем мощнее система синтеза NO, тем более значима будет сосудистая реакция, тогда как у животных с ЭД степень сосудистой реакции будет меньше. При введении N-L-A, ингибитора синтеза эндогенного оксида азота, у интактных и ЛО животных отмечалось падение СМК от 31,8 до 42,6 %. При введении N-L-A животным с ЭСД, ЭНПГ и стрессе наблюдалось падение СМК в 2,6; 3,1 и 1,66 раза соответственно, меньшее, чем падение СМК у интактных животных.

Тест с введением АХ, как в клинической, так и в экспериментальной медицине, является стандартом оценки стимулированной секреции NO и ЭЗВД [14,

Исходная СМК и изменения скорости церебрального кровотока при различных экспериментальных патологиях на фоне введения модификаторов синтеза эндогенного оксида азота

Таблица 2

Группа животных	Исходная СМК, у. е.	Изменение СМК в ответ на введение модификаторов синтеза оксида азота, % к исходным показателям				Индекс ЭД
		АЦХ	НТГ	N-L-A	L-арг	
Интактная1	20,86±1,61	41,52±2,30	47,75±0,95	-35,44±2,33	9,38±3,49	0,13
ЭСД	13,45±1,81**	11,52±,17*	50,01±2,06	-13,55±2,16*	49,65±4,91**	0,77
ЛО	17,69±0,54	36,96±4,04	49,9±1,4	-42,59±5,3	9,08±1,18	0,25
Животные с ЭНПГ	17±0,22	13,59±2,08*	56,04±3,45	-14,04±2,7*	57,39±6,56 **	0,76
Интактная 2	29,66±4,35	38,96±6,2	47,72±5,11	-31,83±2,08	17,02±2,14	0,18
СЖ	20,72±1,21**	17,7±1,08*	41,94±5,11	-19,15±2,49*	45,78±4,98**	0,58

ЭСД — группа животных с экспериментальным сахарным диабетом; ЛО — группа ложнооперированных животных; ЭНПГ — группы животных с экспериментально вызванной недостаточностью половых гормонов; СЖ — стрессированные животные; * - данные статистически достоверны к соответствующей группе интактных и ложнооперированных животных ($p < 0,05$); ** — данные статистически достоверны к соответствующей группе интактных и ложнооперированных животных ($p < 0,01$). Критерий U Мана–Уитни.

16]. Введение АЦХ вызывало повышение СМК от 36 до 41 % в двух интактных группах и у ЛО крыс. Тогда как у животных со ЭСД, ЭНПГ и СЖ наблюдался статистически достоверный по сравнению с интактными крысами меньший прирост скорости церебрального кровотока: соответственно в 3,6, 2,7 и в 1,43 раза меньше по сравнению с показателями контрольных групп животных.

Полученные данные позволяют говорить о том, что при СД, ЭНПГ и стрессе происходит существенное нарушение базального и стимулированного синтеза NO. Данные результаты согласуются с материалами других исследований [1, 2, 13]. Ответ на введение независимого донатора оксида азота НТГ во всех группах крыс статистически не отличался, что свидетельствует о сохранности эндотелионезависимой вазодилатации.

Оценка рассчитанных индексов ЭД дает возможность подтвердить развитие ЭД при патологиях различного генеза. Индексы ЭД у крыс с экспериментальной патологией превышали индексы интактных животных в 5,9 раза у группы с ЭСД, в 3,04 раза — у крыс с ЭНПГ, в 3,2 раза — у СЖ.

Дополнительным маркером ЭД является феномен «L-аргининового парадокса», суть которого заключается в увеличении продукции NO при повышении

концентрации эндогенного L-аргинина в плазме на фоне ЭД, тогда как в условиях нормы дополнительное введение субстрата для синтеза NO не приводит к значимым изменениям его продукции [11, 15]. В ответ на введение L-аргинина СМК у животных интактных и ЛО групп, по сравнению с исходными данными, повышалась незначительно, тогда как у крыс с ЭСД, ЭНПГ и у СЖ подъем СМК по сравнению с интактными крысами был значительно выше, что подтверждает теорию L-аргининового парадокса [5, 12].

Выводы

1. У животных со стрептозотоцининдуцированным СД, с ЭНПГ и у животных, подвергшихся иммобилизационно-болевого стрессу, отмечается выраженное снижение ЭЗВД, связанное со снижением как базальной, так и стимулированной секреции NO.

2. Наиболее выраженная ЭД наблюдается у животных ЭСД, незначительно меньше — при ЭНПГ. При 24-часовом иммобилизационно-болевого стрессе регистрируется отчетливое снижение эндотелиозависимой вазодилатации (ЭЗВД), но менее выраженное, чем при ЭСД и ЭНПГ.

Литература

1. Аметов, А. С. Статины в профилактике и управлении сахарным диабетом 2 типа / А. С. Аметов, Е. В. Сокарева // *Рус. мед. журн.* — 2007. — Т. 15. — № 11. — С. 922–925.
2. Артериальная гипертензия у женщин в постменопаузе: круглый стол // *Кардиология.* — 2003. — № 4. — С. 88–95.
3. Баранов, В. Г. Экспериментальный сахарный диабет / В. Г. Баранов. — Л., 1983. — С. 300.
4. Воробьева, Е. Н. Дисфункция эндотелия — ключевое звено в патогенезе атеросклероза / Е. Н. Воробьева [и др.] // *Рос. кардиол. журн.* — 2010. — № 2. — С. 84–91.
5. Воронков, А. В. Изучение «L-аргининового парадокса» для оценки эндотелиальной функции в норме и патологии / А. В. Воронков, А. И. Робертус, И. Н. Тюренков // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* — 2008. — Т. 7. — № 3. — С. 54–57.
6. Загидуллин, Ш. З. Значение дисфункции эндотелия при сердечно-сосудистых заболеваниях и методы ее медикаментозной коррекции / Ш. З. Загидуллин [и др.] // *Кардиология.* — 2010. — № 5. — С. 54–60.
7. Писарев, В. Б. Механизмы токсического действия стрептозотоцина на β -клетки островков Лангерганса / В. Б. Писарев [и др.] // *Бюлл. эксперимент. биол. и мед.* — 2007. — № 7. — С. 50–53.
8. Тюренков, И. Н. Методический подход к оценке эндотелиальной дисфункции в эксперименте / И. Н. Тюренков, А. В. Воронков // *Эксперимент. и клин. фармакол.* — 2008. — Т. 71. — № 1. — С. 49–51.
9. Тюренков, И. Н. Развитие эндотелиальной дисфункции при недостаточности половых гормонов / И. Н. Тюренков, А. В. Воронков, А. И. Робертус // *Патол. физиол. и эксперимент. терапия.* — 2009. — № 4. — С. 33–36.
10. Шор, Н. А. Состояние микроциркуляции в нижних конечностях при облитерирующем атеросклерозе в ста-

дии критической ишемии до и после восстановительных операций / Н. А. Шор, А. А. Тютюнник // *Методология флюметрии.* — 2002. — № 6. — С. 69–76.

11. Bode-Böger, S. M. The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio / S. M. Bode-Böger, F. Scalera, L. J. Ignarro // *Pharmacol Ther.* — 2007. — № 114 (3). — P. 295–306.

12. Boger, R. H. Association of asymmetric dimethylarginine and endothelial dysfunction / R. H. Boger // *Clin. Chem. Lab. Med.* — 2003. — № 41 (11). — P. 1467–1472.

13. Delacretaz, E. Radial artery compliance in response to mental stress in normotensive offspring of hypertensive parents / E. Delacretaz [et al] // *Clin. Exp. Hypertens.* — 2001. — Vol. 23. — № 7. — P. 545–553.

14. Ludmer, P. L. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries / P. L. Ludmer [et al] // *N. Engl. J. Med.* — 1986. — Vol. 315. — P. 1046–1051.

15. Nakaki, T. The arginine paradox / T. Nakaki, K. Hishikawa // *Nippon Yakurigaku Zasshi.* — 2002. — № 119 (1). — P. 7–14.

16. Owen, M. P. Acetylcholine induced endothelial-dependent vasodilation increases as artery diameter decreases in the rabbit ear / M. P. Owen, J. A. Bevan // *Cellular and Molecular Life Sciences.* — 1984. — № 41 (8). — P. 1057–1058.

17. Toda, N. Cerebral Blood Flow Regulation by Nitric Oxide: Recent Advances / N. Toda, K. Ayajiki, T. Okamura // *Pharmacol Rev.* — 2009. — № 61 (1). — P. 62–97.

18. Vallance, P. Endothelial regulation of vascular tone / P. Vallance // *Postgrad Med. J.* — 1992. — № 68. — P. 697–701.

19. Versari, D. Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease / D. Versari [et al] // *Diabetes Care.* — 2009. — № 32. — P. 314–321.