



## СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПУТЕМ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ

**А.И. МАЯКОВ<sup>1</sup>, М.В. ПОКРОВСКИЙ<sup>2</sup>  
Т.Г. ПОКРОВСКАЯ<sup>2</sup>, А.С. БЕЛОУС<sup>2</sup>  
А.А. АРУСТАМОВА<sup>1</sup>, М.В. КОРОКИН<sup>2</sup>  
О.С. ГУДЫРЕВ<sup>2</sup>, М.В. МАЯКОВА<sup>2</sup>**

<sup>1)</sup> *Белгородский государственный национальный исследовательский университет*

<sup>2)</sup> *Курский государственный медицинский университет*

*e-mail: facies@yandex.ru*

Эндотелиальную дисфункцию моделировали посредством билатеральной овариэктомии лабораторному животному и в течение 6 недель добавлением в корм фруктозы, удельный вес которой составлял 60% от общего рациона, а также ежедневным однократным раздражением электрическим током, длительностью 10 мсек., напряжением 30 В, силой 0,66 мА, пропускаемым через электроды, наложенные на хвост животного. При этом степень развития эндотелиальной дисфункции оценивали по коэффициенту эндотелиальной дисфункции, а формирование метаболических нарушений – по изменению уровня гликемии в оральном тесте толерантности к глюкозе. Данная модель может быть использована для оценки фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции при воспроизведении метаболических нарушений.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция, фруктозодержащая диета, электрический ток, метаболические нарушения, инсулинорезистентность.

**Введение.** Частое сочетание сердечно-сосудистых заболеваний и различных метаболических расстройств давно привлекало внимание клиницистов. Метаболический синдром в популяции составляет 10–24 %, при этом артериальная гипертензия (АГ) присутствует более чем в половине случаев [3]. «Кардиометаболический континуум», - сочетание АГ и метаболических нарушений, несет в себе угрозу преждевременной инвалидизации и смерти от сердечно-сосудистых осложнений [1, 2].

Несомненное участие в прогрессировании АГ при метаболических нарушениях вносит дисфункция эндотелия (ДЭ), развивающаяся в условиях инсулинорезистентности и выражающаяся в снижении секреции и биодоступности оксида азота (NO) и повышении секреции мощнейшего вазоконстриктора – эндотелина-1 [8, 11]. Неоспоримым является тот факт, что эндотелиальная дисфункция является первым звеном в развитии атеросклероза, связанного с синдромом инсулинорезистентности [5, 10, 12]. В этой связи стратегия в поиске способов коррекции метаболических нарушений лежит на изучении развития эндотелиальной дисфункции.

**Целью** настоящего исследования явилось создание способа моделирования эндотелиальной дисфункции путем воспроизведения метаболических нарушений, включающих формирование стрессмодифицирующего компонента.

**Методика исследования.** Опыты проводились на 30-ти половозрелых белых самках линии Wistar массой 250-300 г. В первый день эксперимента у самок под наркозом (хлоралгидрат 300 мг/кг) хирургическим путем вскрывали брюшную полость и удаляли оба яичника. В дальнейшем на протяжении 6 недель в корм животных добавляли фруктозу, удельный вес которой равен 60% от общего рациона пищи. В течение всего срока кормления ежедневно однократно вызывали болевое раздражение хвоста животных электрическим током (длительностью 10 мс, напряжением 30 В, силой 0,66 мА), пропускаемым через электроды, наложенные на смоченный физиологическим раствором хвост животного. Положительный электрод прикрепляли на расстоянии 1 см от корня хвоста, отрицательный – в полутора сантиметрах книзу от него. Еженедельно, однократно, в утреннее время, натощак, в течение всего срока эксперимента измеряли уровень глюкозы в крови, взятой из вены хвоста животных, при помощи глюкометра Satellit Plus (Россия). На 6-й неделе эксперимента проводился тест толерантности к глюкозе, натощак, путем орального введения глюкозы (1 мг/кг) и регистрации уровня глюкозы на протяжении 120 минут при помощи глюкометра Satellit Plus (Россия). В течение кормления ежедневно измеряли показатели артериального давления с использованием неинвазивного датчика измерения кровяного давления у мелких животных на хвосте Doc-NIBP200A, производства Biopac System, Inc., США. На 42-й день от начала эксперимента под нарко-

зом (Этаминал-натрия 50 мг/кг) вводили катетер в правую сонную артерию для регистрации показателей артериального давления (АД), болюсное введение фармакологических агентов осуществляли в левую бедренную вену. Показатели гемодинамики: систолическое артериальное давление (САД), диастолическое артериальное давление (ДАД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) измеряли непрерывно посредством датчика TSD104A аппаратно-программного комплекса MP100, производства Biopac System, Inc., США. Проводили следующие функциональные сосудистые пробы – эндотелийзависимая вазодилатация (ЭЗВ) с внутривенное введение ацетилхолина (АХ) в дозе 40 мкг/кг; – эндотелийнезависимая вазодилатация (ЭНЗВ) с внутривенное введение нитропруссид натрия (НП) в дозе 30 мкг/кг. Степень эндотелиальной дисфункции у экспериментальных животных оценивали по расчетному коэффициенту эндотелиальной дисфункции (КЭД), представляющее собой отношение площади треугольника над кривой восстановления АД в ответ на введение НП (ЭНВД) к площади треугольника над кривой восстановления АД в ответ на введение АХ (ЭЗВД) [4].

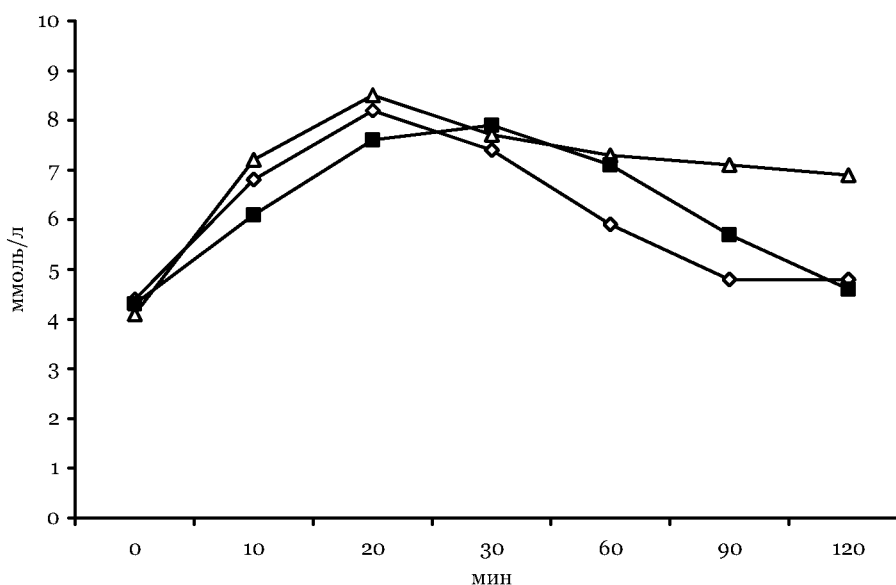


Рис. 1. Динамика уровня глюкозы плазмы крови крыс в пероральном тесте толерантности глюкозы на 6-й неделе эксперимента

На рисунке изображено:

- △ Группа животных с билатеральной овариэктомией, получавших фруктозосодержащую диету с нанесением болевого раздражения;
- Группа животных с билатеральной овариэктомией, получавших обычный рацион;
- ◇- Интактная группа.

Результаты подвергали статистической обработке путем расчета средней арифметической (M), ошибки средней арифметической ( $\pm m$ ) и оценки достоверности различий сравниваемых параметров с использованием t-test для групп с равной дисперсией, уровень значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования.** Экспериментальные исследования проводили на следующих группах животных: интактные (И) – животные, у которых проводилась ложная операция (вскрытие брюшной полости с последующим ушиванием); животные с билатеральной овариэктомией (БО), получавших обычный пищевой рацион; животные с билатеральной овариэктомией, которым давалась фруктозосодержащая диета и наносилось болевое раздражение электрическим током (БОФБ). Измерение уровня глюкозы натощак на протяжении 6 недель не выявило изменения значений во всех исследуемых группах животных относительно нормальных показателей. В то время как, при проведении теста толерантности к глюкозе, наблюдалось незначительное снижение уровень гликемии к 120 минуте в группе БОФБ относительно групп И и БО, этот показатель был достоверно выше и составил  $6,9 \pm 0,4$  ммоль/л. В группе И и БО таковые значения глюкозы крови приближались к исходным на 120 минуте и составляли -  $4,8 \pm 0,2$  и  $4,6 \pm 1,2$  ммоль/л соответственно (см. рис. 1).



Измерение уровня систолического артериального давления неинвазивным способом выявило достоверное его повышение в группах БО и БОФБ, по сравнению с интактными животными и начиная с 4-ой недели развития патологии находилось на уровне  $153,9 \pm 4,4$  и  $155,2 \pm 4,1$  мм рт.ст. соответственно (табл. 1).

Таблица 1

**Динамика уровня артериального давления, определяемого неинвазивным способом, при моделировании эндотелиальной дисфункции на фоне воспроизведения метаболических нарушений (n=10, M±m, мм рт.ст.)**

Группы животных	Артериальное давление	1 нед.	2 нед.	3 нед.	4 нед.	5 нед.	6 нед.
Интактные (И)	САД	$136,7 \pm 3,4$	$136,6 \pm 3,4$	$136,9 \pm 3,6$	$136,8 \pm 3,5$	$136,9 \pm 3,6$	$137,1 \pm 3,6$
	ДАД	$83,7 \pm 2,7$	$84,5 \pm 2,4$	$84,1 \pm 3,1$	$85,2 \pm 3,1$	$84,3 \pm 2,9$	$84,8 \pm 2,7$
Билатеральная овариэктомия (БО)	САД	$135,8 \pm 3,3$	$141,2 \pm 3,9$	$147,4 \pm 4,1^*$	$153,9 \pm 4,4^*$	$157,1 \pm 4,2^*$	$159,5 \pm 4,6^*$
	ДАД	$85,1 \pm 2,3$	$87,2 \pm 3,2$	$92,1 \pm 3,5^*$	$94,5 \pm 4,1^*$	$97,1 \pm 4,2^*$	$98,3 \pm 3,9^*$
Билатеральная овариэктомия + Фруктозосодержащая диета + Болевое раздражение (БОФБ)	САД	$136,1 \pm 3,4$	$142,3 \pm 4,0$	$149,1 \pm 4,7^*$	$155,2 \pm 4,1^*$	$161,8 \pm 4,1^*$	$165,7 \pm 4,3^*$
	ДАД	$84,3 \pm 3,3$	$88,1 \pm 2,7$	$89,7 \pm 3,1^*$	$95,7 \pm 3,8^*$	$97,4 \pm 4,6^*$	$101,2 \pm 5,1^*$

Примечание: \* –  $p < 0,05$  в сравнении с группой интактных.

При проведении исследований на наркотизированных животных с инвазивным определением параметров гемодинамики получили следующие данные: болюсное внутривенное введение АХ в течение 3-5 сек приводило к резкому падению артериального давления, достигающего пика у ложнооперированных животных (для систолического артериального давления (САД)  $84,3 \pm 4,4$ , для диастолического артериального давления (ДАД) –  $38,7 \pm 2,8$  и для среднего артериального давления (СрАД)  $53,9 \pm 2,7$  мм рт. ст.). При этом в течение первых 2-3 сек развивалась резкая брадикардия до 130-150 ударов в минуту.

Восстановление АД происходило в среднем за  $42,2 \pm 0,8$  сек. после нормализации сердечного ритма. ЭНЗВ также характеризовалась снижением САД до  $83,0 \pm 3,7$ , ДАД до  $42,1 \pm 4,4$  и СрАД до  $55,7 \pm 3,5$  мм рт.ст. с последующим полным восстановлением в среднем в течение  $45,1 \pm 1,0$  сек.

У животных с билатеральной овариэктомией, получавших обычный рацион, через 6 недель отмечалось достоверное увеличение цифр АД: САД –  $160,0 \pm 6,2$ , ДАД –  $124,9 \pm 5,5$ , СрАД –  $135,9 \pm 5,0$  мм рт. ст. по сравнению с интактной группой животных. ЭЗВ и ЭНЗВ характеризовались достоверно меньшим снижением (табл. 2).

Таблица 2.

**Динамика показателей АД и ЧСС при моделировании эндотелиальной дисфункции на фоне воспроизведения метаболических нарушений (n=10, M±m)**

Группы животных	Функциональные пробы	САД, мм рт.ст.	ДАД, мм рт. ст.	ЧСС, уд. в мин.
Интактные (И)	Исходные	$137,7 \pm 3,7$	$101,9 \pm 4,3$	$420,0 \pm 9,0$
	ЭЗВ с АХ	$84,3 \pm 4,5$	$38,7 \pm 2,8$	$416,0 \pm 14,0$
	ЭНЗВ с НП	$83,0 \pm 3,7$	$42,1 \pm 4,4$	$415,0 \pm 10,0$
Билатеральная овариэктомия (БО)	Исходные	$160,0 \pm 6,2^*$	$124,9 \pm 5,5^*$	$385,0 \pm 13,0$
	ЭЗВ с АХ	$91,8 \pm 8,0$	$57,3 \pm 7,1^*$	$385,0 \pm 9,0$
	ЭНЗВ с НП	$87,4 \pm 7,5^*$	$57,8 \pm 6,6$	$397,0 \pm 8,0$
Билатеральная овариэктомия + Фруктозосодержащая диета + Болевое раздражение (БОФБ)	Исходные	$167,4 \pm 3,9^{**}$	$122,9 \pm 5,2$	$364,7 \pm 15,2$
	ЭЗВ с АХ	$87,4 \pm 3,2$	$53,4 \pm 3,8$	$328,2 \pm 23,4$
	ЭНЗВ с НП	$95,6 \pm 9,1^{**}$	$51,2 \pm 5,0$	$359,1 \pm 14,2$

Примечание: \* –  $p < 0,05$  в сравнении с группой интактных;

\*\* –  $p < 0,05$  в сравнении с группой животных, у которых проводилась билатеральная овариэктомия и получавших обычный пищевой рацион.

Ежедневное, в течение 6 недель, введение фруктозосодержащей диеты в рацион питания животных на фоне гипозэстрогении и ежедневного однократного болевого раздражения электрическим током вызывало более значимую артериальную гипертензию (САД –  $167,4 \pm 3,9$ , ДАД –  $122,9 \pm 5,2$ , СрАД –  $137,7 \pm 4,5$  мм рт. ст.) и приводила к меньшему снижению показателей АД после введения АХ (САД до  $87,4 \pm 3,2$ , ДАД до  $53,4 \pm 3,8$ , СрАД до  $64,8 \pm 2,8$  мм рт. ст.) и НП (САД до  $95,6 \pm 9,1$ , ДАД до  $51,2 \pm 5,0$  и СрАД до  $66,0 \pm 5,2$  мм рт. ст.) по сравнению с интактными животными и животными с билатеральной овариэктомией, получавших обычный рацион (табл. 3).

Таблица 3.

**Показатели, отражающие степень эндотелиальной дисфункции на фоне воспроизведения метаболических нарушений (n=10, M±m)**

Группы животных	Функциональные пробы	Прирост падения сосудистой реакции по СрАД (мм рт.ст.)	Время сосудистой реакции (сек.)	Площадь сосудистой реакции (усл. ед)	Отношение площадей сосудистой реакции АХ к НП
Интактные (И)	АХ	$59,9 \pm 2,9$	$42,2 \pm 0,8$	$1268,0 \pm 74,8$	$1,1 \pm 0,1$
	НП	$61,0 \pm 3,0$	$45,1 \pm 1,0$	$1375,3 \pm 93,7$	
Билатеральная овариэктомия (БО)	АХ	$67,8 \pm 7,3$	$33,0 \pm 5,4$	$1022,5 \pm 131^*$	$2,1 \pm 0,2^*$
	НП	$70,0 \pm 6,0$	$46,0 \pm 4,5$	$2157,3 \pm 167^*$	
Билатеральная овариэктомия + Фруктозосодержащая диета + Болевое раздражение (БОФБ)	АХ	$62,5 \pm 5,7$	$38,3 \pm 4,3$	$1252,8 \pm 244,4$	$3,3 \pm 0,3^{**}$
	НП	$70,0 \pm 6,0$	$102,4 \pm 11,9$	$3668,5 \pm 635,5$	

Прмечание: \* –  $p < 0,05$  в сравнении с группой интактных;

\*\* –  $p < 0,05$  в сравнении с группой животных, у которых проводилась билатеральная овариэктомия и получавших обычный пищевой рацион.

Восстановление АД при введении АХ и НП происходило в среднем за  $38,3 \pm 4,3$  сек. и  $102,4 \pm 11,9$  сек. после нормализации сердечного ритма соответственно (табл. 3).

Значения КЭД составили:  $1,1 \pm 0,1$  – в группе интактных животных,  $2,1 \pm 0,2$  – в группе животных с билатеральной овариэктомией, получавших обычный пищевой рацион, а в группе животных с билатеральной овариэктомией, которым давалась фруктозосодержащая диета и наносилось болевое раздражение электрическим током, –  $3,3 \pm 0,3$ , что достоверно больше в сравнении с вышеуказанными группами.

**Обсуждение.** За основу настоящей модели было положено гипострогенное состояние в условиях инсулинорезистентности и стрессмодифицирующего фактора. Известно, что гипозэстрогения, которая возникает в менопаузе у женщин, играет роль пускового фактора в развитии комплекса тесно связанных между собой метаболических нарушений [6]. Развитие же инсулинорезистентности является одним из патогенетических механизмов менопаузального метаболического синдрома. Параллельно развитию гипозэстрогении происходит снижение чувствительности периферических тканей к инсулину, с формированием резистентности, что ведет к повышению его уровня в крови. Инсулинорезистентность оказывает неблагоприятное влияние на эндотелий сосудов, активирует пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток, процесс липогенеза в сосудистой стенке, угнетает процессы фибринолиза, ведет к повышению артериального давления вследствие резистентности сосудов, негативно влияет на распределение жировой ткани.

В гипозэстрогенном состоянии в эндотелии наблюдается прогрессирующее снижение синтеза оксида азота, обладающего сосудорасширяющим эффектом, а уровень сосудоуживающего эндотелина 1 возрастает. Эндотелиальная дисфункция характеризуется отсутствием способности сосудов реагировать расширением на биологически активные вещества, например ацетилхолин. Кроме того, в условиях гипозэстрогении в сосудистой стенке наблюдается активация перекисного окисления липидов, что еще больше усугубляет нарушение сосудодвигательной функции. Повышается уровень фак-



тора VII свертывающей системы крови, фибриногена и ингибитора активации плазминогена I. Гипоэстрогемия вызывает снижение синтеза простаглицина, что приводит к снижению агрегации тромбоцитов, повышению образования тромбосана и, как следствие, повышению агрегации тромбоцитов [6].

В качестве стрессмодифицирующего компонента использовался электрический ток, хроническое пороговое воздействие которого изменяет заряд мембраны эндотелия, повышает выработку катехоламинов, тканевого АПФ и ангиотензина II, приводящих к спазму сосудов [7, 9].

Настоящее исследование выявило достоверное повышение КЭД, отражающего степень развития эндотелиальной дисфункции, в группе животных с билатеральной овариэктомией, которым давалась фруктозосодержащая диета и наносилось болевое раздражение электрическим током, по сравнению с группой интактных животных. Оценка метаболических нарушений по изменению уровня гликемии к 120-й минуте в оральном тесте толерантности к глюкозе выявило формирование инсулинорезистентности в этой же группе животных по сравнению с другими исследуемыми группами.

Таким образом, способ позволяет оценить динамику формирования эндотелиальной дисфункции моделировании метаболических нарушений с использованием фруктозосодержащей диеты и электрического тока. Данная модель может быть использована для оценки фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции при воспроизведении метаболических нарушений.

### Литература

1. Бритов, А.Н. Артериальная гипертония при метаболическом синдроме. Возможности антигипертензивной терапии / А.Н. Бритов, М.А. Уметов // РМЖ. – 2005. – № 26. – С. 1713-1720.
2. Вихирева, О.В. Артериальная гипертония: проблемы и решения / О.В. Вихирева // Международный медицинский бюллетень. – 2003. – № 15. – С. 17
3. Луценко, Н.С. Юмактеричний синдром з позиції старіння та вітаукта / Н.С. Луценко, І.В. Ломака, І.Н. Кириченко // Вісник асоціації акушерів-гинекологів України. – 2001. – № 3(13). – С.35-38.
4. Маколкин, В.И. Применение высокоселективного β-адреноблокатора небиволола у больных метаболическим синдромом / В.И. Маколкин // Трудный пациент. – 2006. – №5. – С. 25.
5. Маяков, А.И. Эндотелиальная дисфункция на фоне фруктоз-индуцированной модели метаболических нарушений у крыс / А.И. Маяков, Т.Г. Покровская, М.В. Покровский // XVII Российский Национальный конгресс «Человек и лекарство». Сборник материалов конгресса. – М., 2010. – С. 676-677.
6. Маяков, А.И. Фруктоз-индуцированная модель эндотелиальной дисфункции у крыс / А.И. Маяков, К.А. Шуклина, В.Ю. Цепелев // Материалы 74-й межвузовской итоговой научной конференции студентов и молодых ученых: Молодежная наука и современность, посвященной Году молодежи в России. 21-22 апреля 2009 года. В 3 ч. – Курск: ГОУ ВПО КГМУ. – 2009. – Ч II. С. 193
7. Патент С 22301015 RU А 61 В5/02. Способ оценки эндотелиальной дисфункции / Покровский М.В., Покровская Т.Г., Кочкаров В.И. // № 2005113243/14; Заявл. 04.05.2005/17 Изобретения (Заявки и патенты).- 2007.- №17.
8. Покровский, М.В. Новый взгляд на коррекцию эндотелиальной дисфункции / М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, Т.Г. Покровская // Российский журнал иммунологии. – М., 2006., Т. 9. – С. 60-61.
9. Покровский, М.В. Методические подходы для количественной оценки развития эндотелиальной дисфункции при L-NAME-индуцированной модели дефицита оксида азота в эксперименте / М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, Т.Г. Покровская // Кубанский научно-медицинский вестник. – Краснодар, 2006. – №10. – С.72-77.
10. Шестакова, М.В. Дисфункция эндотелия – причина или следствие метаболического синдрома? / М.В. Шестакова. РМЖ. – 2001. – №9 (2). – С.88-93.
11. Griendling, K.K. Oxidative stress and cardiovascular disease / K.K. Griendling, R.W. Alexander // Circulation. – 1997. – №96. – P.3264-3265.
12. Lissner, I. Fasting insulin in relation to subsequent blood pressure changes and hypertension in women / I. Lissner, C. Bengtsson, L. Lapidus et al. // Hypertension. – 1992. – №20. – P. 797-801.
13. Meredith, I.T. Role of impaired endothelium-dependent vasodilation in ischemic manifestations of coronary artery disease / I.T. Meredith, A.C. Yeung, F.F. Weidinger et al. // Circulation. – 1993. – №87 (S.V). – P. 56-66.

14. Schiffrin, E.L. Angiotensin II Receptor antagonists Eds. M. Epstein, H.R. Brunner / E.L. Schiffrin, D. Hayoz // Philadelphia: Hanley Belfus INC. – 2001. – P.279-289.

15. Skarfors, E.T. Risk factors for the development of hypertension: a 10-year longitudinal study in middle-aged men / E.T. Skarfors, H.O. Litbell, I. Selinus // J Hypertens. – 1991. – № 9. – P.217-223

16. Taddei, S. The pivotal role of endothelium in hypertension / S. Taddei, A. Viridis, L. Chia-doni // Medicographia. – 1999. – Issue 59, №21. – P.22- 29.

## **METHOD OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION MODELING BY SIMULATING THE METABOLIC DISORDERS**

**A.I. MAYAKOV<sup>1</sup>, M.V. POKROVSKY<sup>2</sup>  
T.G. POKROVSKAYA<sup>2</sup>, A.S. BELOUS<sup>2</sup>  
A.A. ARUSTAMOVA<sup>1</sup>, M.V. KOROKIN<sup>2</sup>  
O.S. GUDYREV<sup>2</sup>, M.V. MAYAKOVA<sup>2</sup>**

<sup>1)</sup> *Belgorod National  
Research University*

<sup>2)</sup> *Kursk State  
Medical University*

*e-mail: facies@yandex.ru*

Endothelial dysfunction was modeled by means of bilateral ovariectomy at laboratory animals and during the 6 weeks of the addition of fructose feeding, the volume of which was 60% of the total diet, as well as daily single stimulus of electric shock, duration 10ist., voltage 30V, 0.66mA power transmitted through electrodes placed on the tail of the animal. The degree of endothelial dysfunction assessed by the coefficient of endothelial dysfunction, and the formation of metabolic disorders by changing the level of blood glucose in oral glucose tolerance test. This model can be used to evaluate the pharmacological correction of endothelial dysfunction during playback of metabolic disorders.

Key words: endothelial dysfunction, fructose diet, electric current, metabolic disorders, insulin resistance.