



УДК 615.22-008.331.1

ОЦЕНКА ДИНАМИКИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИН- И L-NAME-ИНДУЦИРОВАННОГО ДЕФИЦИТА NO

М.В. КОРОКИН
М.В. ПОКРОВСКИЙ
В.И. КОЧКАРОВ
О.С. ГУДЫРЕВ
Л.В. КОРОКИНА
Т.Г. ПОКРОВСКАЯ
В.А. САВИН

*Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет*

e-mail: mkorokin@mail.ru

Проведена оценка функциональных и биохимических показателей при моделировании гипергомоцистеин- и L-NAME индуцированного дефицита оксида азота. Установлено что внутрижелудочное введение метионина в дозе 3 г/кг и внутрибрюшинное введение L-NAME в дозе 25 мг/кг вызывает разной степени выраженный комплекс изменений функциональных и биохимических показателей функционирования нитрооксидэргической системы. Указанные модели дефицита оксида азота следует признать адекватными, физиологически обоснованными экспериментальными моделями эндотелиальной дисфункции, которые могут быть использованы для изучения возможностей и путей фармакологической коррекции эндотелий-ассоциированной патологии.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция, метионин, L-NAME, гипергомоцистеинемия, ADMA.

Изучение возможностей фармакологической коррекции нарушений метаболизма оксида азота в эксперименте требует выбора патофизиологической модели эндотелиальной дисфункции с созданием условий наиболее приближенных к клинической ситуации. Принимая этот факт во внимание, установление взаимосвязи фармакологических изысканий с формированием объективной методологии оценки, явилось задачей данного исследования, посвященного разработке методологических подходов к экспериментальному моделированию эндотелиальной дисфункции и дефицита оксида азота.

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ № МК-905.2012.4.

Материалы и методы. Опыты проводились на белых крысах-самцах линии Wistar массой 200-250 г. Блокатор NO-синтазы N-нитро-L-аргинин метиловый эфир

(L-NAME) вводился внутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг/сут, один раз в сутки в течение 7 дней. Раствор для внутрижелудочного введения метионина в дозе 3 г/кг готовили *ex tempore* с помощью полисорбата ТВИН-80 и 1% крахмального раствора.

Животные были разделены на группы (n=10): 1 – ежедневное, 1 раз в сутки, в течение 7 дней внутрижелудочное введение 10% раствора ТВИН 80 в дозе 1 мл/кг; 2 – ежедневное, 1 раз в сутки, внутрижелудочное введение метионина в дозе 3 г/кг в течение 7 дней; 3 – интактные; 4 – ежедневное, 1 раз в сутки, внутрибрюшинное введение L-NAME в дозе 25 мг/кг.

На 8 день от начала эксперимента под наркозом (хлоралгидрат 300 мг/кг) вводили катетер в левую сонную артерию для регистрации показателей артериального давления (АД), болюсное введение фармакологических агентов осуществляли в бедренную вену. Показатели гемодинамики: систолическое артериальное давление (САД), диастолическое артериальное давление (ДАД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) измеряли непрерывно посредством аппаратно-программного комплекса "Віорас". Помимо измерения АД проводили ряд функциональных проб, проводимых в представленной последовательности: 1. Проба на эндотелийзависимое расслабление сосудов (внутривенное введение раствора ацетилхолина (АХ) в дозе 40 мкг/кг из расчета 0,1 мл на 100г). 2. Проба на эндотелийнезависимое расслабление сосудов (внутривенное введение раствора нитропруссиды натрия (НП) в дозе 30 мкг/кг из расчета 0,1 мл на 100г) [3, 7, 8, 9].

Степень эндотелиальной дисфункции у экспериментальных животных, а также степень ее коррекции исследуемыми препаратами оценивали по расчетному коэффициенту эндотелиальной дисфункции (КЭД) [3, 6, 7].

Для оценки функциональных возможностей миокарда у животных, находящихся на управляемом дыхании, катетеризировали полость левого желудочка и проводили нагрузочные пробы в представленной последовательности: 1. Проба на адренореактивность (внутривенное



одномоментное введение раствора адреналина гидрохлорида 1.10^{-5} моль/л, из расчёта 0,1 мл на 100 г) [2]. При проведении данной пробы проводилась оценка максимального подъема левожелудочкового давления (ЛЖД) в ответ на введение адреналина. 2. Нагрузка сопротивлением (пережатие восходящей аорты на 30 сек [2]). После проведения данной пробы рассчитывался показатель истощения миокардиального резерва (выраженный в процентах), равный отношению прироста ЛЖД на 5 секунде пережатия аорты к приросту ЛЖД на 25 секунде пережатия аорты.

Биохимическими маркерами эндотелиальной дисфункции служили показатели концентрации стабильных метаболитов оксида азота (Total NOx) и экспрессии эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) [4]. Степень развития гипергомоцистеинемии оценивали по содержанию гомоцистеина в сыворотке крови экспериментальных животных. Концентрацию гомоцистеина определяли методом иммунотурбодиметрии с помощью набора фирмы Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o.

Для морфологического подтверждения развития моделируемых патологических процессов проведено гистологическое исследование сердца. Материал фиксирован в 10% формалине с последующей заливкой в парафин. Использована окраска гематоксилином и эозином. При морфометрии сердца использован метод определения поперечного диаметра кардиомиоцитов по методике Г.Г. Автандилова.

Достоверность изменений абсолютных параметров определяли разностным методом вариационной статистики с нахождением средних значений сдвигов (M), средней арифметической ($\pm m$) и вероятности возможной ошибки (p) по таблицам Стьюдента. Различия оценивали как достоверные при $p < 0,05$. Статистические расчёты проводились с использованием программы Microsoft Excel 7.0.

Результаты. Эндотелиальную дисфункцию, вызванную метионин индуцированной гипергомоцистеинемией (гипергомоцистеин индуцированная ЭД) моделировали ежедневным внутрижелудочным введением крысам-самцам аминокислоты метионин в дозе 3 г/кг. Эндотелиальную дисфункцию, вызванную дефицитом оксида азота моделировали в/б введением в течение 7 дней крысам-самцам ингибитора фермента eNOS N-нитро-L-аргинин метилового эфира в дозе 25 мг/кг (L-NAME-индуцированная ЭД).

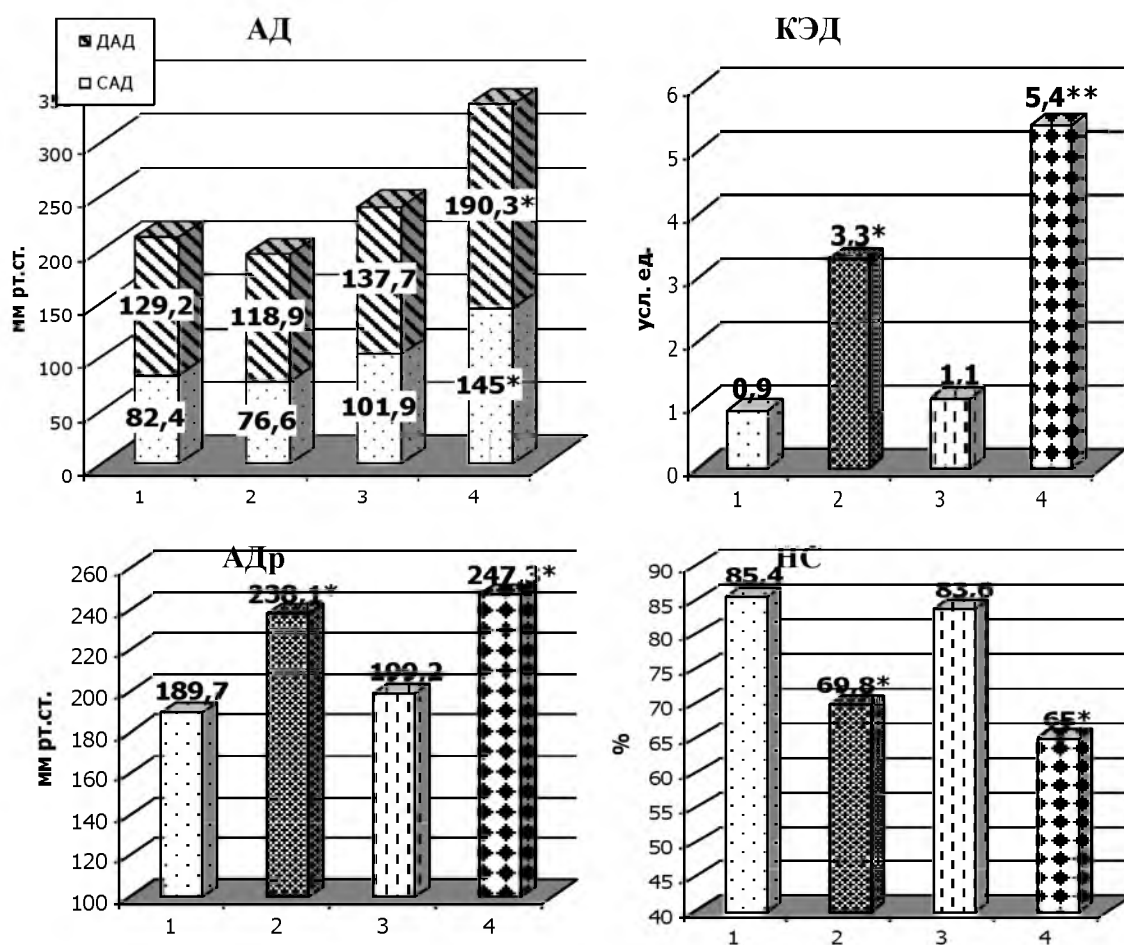
Внутрижелудочное введение метионина в дозе 3 г/кг однократно в сутки в течение 7 дней не привело к статистически значимому изменению артериального давления. Внутривентриальное введение L-NAME в дозе 25 мг /кг однократно в сутки в течение 7 дней крысам-самцам, привело к стойкому и статистически значимому повышению артериального давления (рис. 1АД).

Проведение функциональных проб с оценкой реакций на эндотелий- зависимое и эндотелийнезависимое расслабление сосудов показало существенные отличия в группах с патологией от группы интактных животных и животных контрольной серии, получавших соллюбилизатор ТВИН 80.

При анализе результатов функциональных проб обнаружено что КЭД в группе интактных самцов составил $-1,1 \pm 0,1$, при L-NAME индуцированном дефиците оксида азота $-5,4 \pm 0,6$, в контрольной группе животных, получавших ТВИН 80 $-0,9 \pm 0,2$, при гипергомоцистеин индуцированном дефиците оксида азота $-3,3 \pm 0,3$ (рис. 1КЭД).

Гипергомоцистеин и L-NAME индуцированные модели патологии приводят к увеличению абсолютных значений ЛЖД в пробе на адренореактивность и снижению миокардиального резерва в пробе нагрузки сопротивлением (рис. 1АДр, рис. 1НС).

У интактных самцов миокардиальный резерв к 25 секунде проведения пробы составлял $83,6 \pm 7,7$ относительно значений на 5-й секунде, в контрольной группе животных $85,4 \pm 6,1$, а у животных с гипергомоцистеин и L-NAME индуцированной патологией данный показатель был значительно ниже и составил соответственно $65 \pm 5,5\%$ и $69,8 \pm 4,7\%$ (рис. 1НС).



1 – Твин 80 (контроль); 2 – Метионин 3 г/кг; 3 – Интактные; 4 – L-NAME

Рис. 1. Функциональные показатели при моделировании гипергомоцистеин и L-NAME индуцированного дефицита NO. Примечание: САД, ДАД, АД систолическое, диастолическое артериальное давление, КЭД – коэффициент эндотелиальной дисфункции, АДр – адренореактивность, НС – нагрузка сопротивлением. * – $p < 0,05$ в сравнении с группой интактных животных

Характерная динамика биохимических маркеров гипергомоцистеин и L-NAME индуцированного дефицита оксида азота представлена на рисунке 2. Экспрессия эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) при L-NAME индуцированной патологии составила 21,4±4,7%, тогда как у интактных животных – 72,9±3,8% (рис. 1eNOS).

Концентрация стабильных метаболитов оксида азота (NOx) у животных, получавших L-NAME и метионин, соответственно, составила 61,2±3,6 и 72,9 ±4,6 мкМоль, тогда как соответствующие значения у интактных животных составили – 114,1±4,1 и 121,2±7,4 мкМоль (рис. 2NOx).

Внутрижелудочное введение метионина в дозе 3 г/кг привело к статистически значимому увеличению концентрации гомоцистеина. Так в контрольной группе животных, получавших ТВИН 80 данный показатель составил 8,6±1,4 мкМоль/л, в группе животных, получавших метионин – 53,5±8,1 мкМоль/л (рис. 2НСy)

Таким образом, внутрижелудочное введение метионина в дозе 3 г/кг 1 раз в сутки на протяжении 7 дней, не вызывает статистически значимого повышения артериального давления. Нарушение функции эндотелия проявляется повышением КЭД, увеличением адренореактивности и истощением миокардиального резерва, что свидетельствует о снижении способности миокарда адаптироваться к повышенной постнагрузке при гипергомоцистеин индуцированной эндотелиальной дисфункции.

Физиологические изменения подтверждаются результатами биохимических исследований. Так моделирование метионин индуцированной гипергомоцистеинемии привело к статистически значимому снижению концентрации стабильных метаболитов оксида азота и увели-



чению концентрации гомоцистеина. Одновременно при L-NAME индуцированной эндотелиальной дисфункции обнаруживается симптомокомплекс, включающий стойкое повышение артериального давления, увеличение КЭД, адренореактивности падение миокардиального резерва, снижение концентрации стабильных метаболитов оксида азота, экспрессии eNOS, увеличение поперечного диаметра кардиомиоцитов.

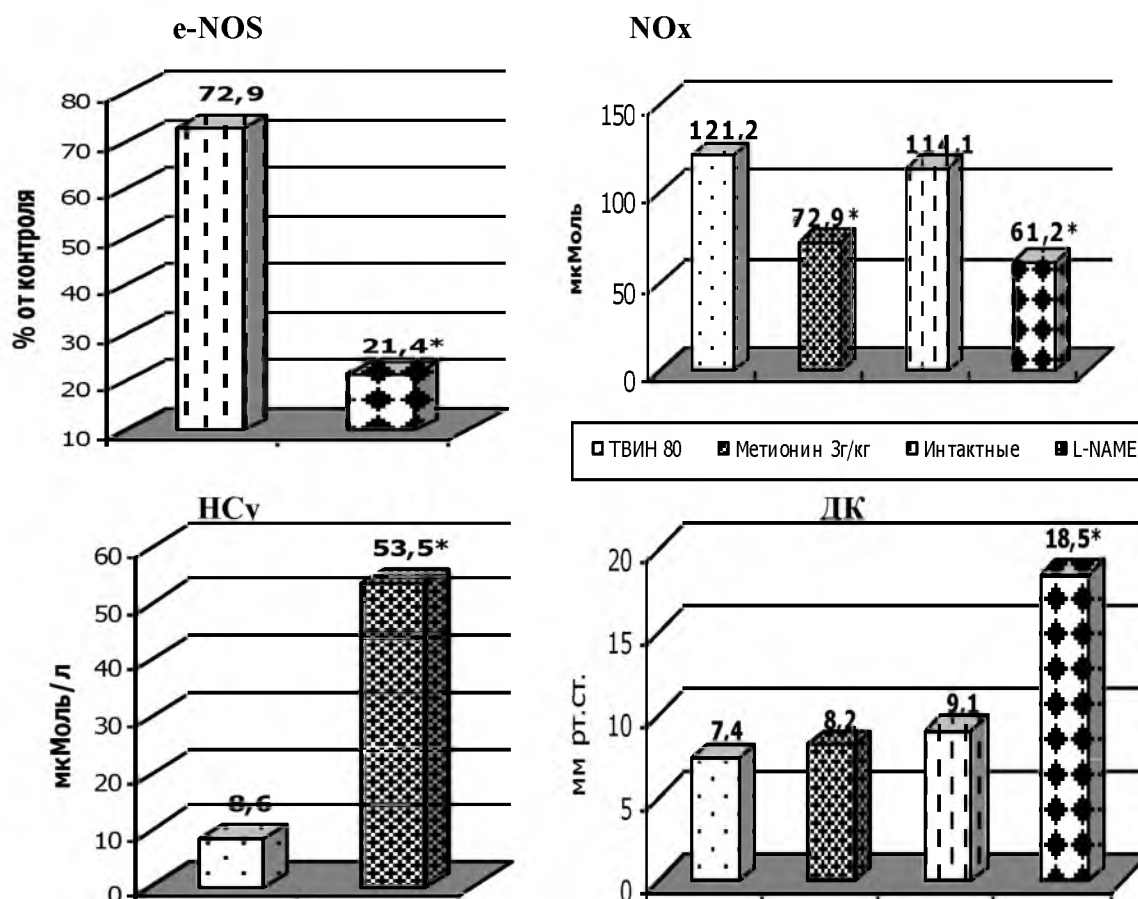


Рис.2. Функциональные, биохимические и морфологические показатели при моделировании гипергомоцистеин и L-NAME индуцированного дефицита NO. Примечание: NOS – экспрессия NO-синтазы, НСy – концентрация гомоцистеина; NOx – суммарная концентрация нитритов и нитратов плазмы, ДК – диаметр кардиомиоцитов. * – $p < 0,05$ в сравнении с группой интактных животных

Обсуждение результатов. Взаимосвязь повышения концентрации гомоцистеина в плазме крови и увеличения риска сердечно-сосудистой патологии достоверно установлена в ходе ряда масштабных исследований. У 1041 пожилых мужчин и женщин в рамках Фраммингемского исследования (Framingham Heart Study) было показано, что риск стеноза сонной артерии повышался в зависимости от величины уровня гомоцистеина. В исследовании NHLBI (Family Heart Study), включающем 1467 лиц, обнаружили, что у обследуемых старше 55 лет, после исключения других факторов риска, имеется достоверная положительная связь толщины стенки сонной артерии с уровнем гомоцистеина.

D.Lang, M.Kredan и соавт. высказали мнение о связи гомоцистеина с продукцией оксида азота (NO) через NO-синтазу, что позволило объяснить механизм дисфункции эндотелия. Более того, гомоцистеин как метаболит с высокой прооксидантной активностью способен вмешиваться в дисульфидообразование, что помимо функциональных расстройств эндотелиоцитов стимулирует пролиферацию гладкомышечных клеток артериальных сосудов, вызывая их ремоделирование. Гомоцистеин приводит к ингибированию эффектов NO, снижает его биодоступность, влияет на чувствительность тканей к нему.



Полученные экспериментальные данные позволили установить, что коэффициент эндотелиальной дисфункции на фоне внутрижелудочного введения метионина достоверно повышался до $3,3 \pm 0,3$ ($0,9 \pm 0,2$ в контрольной группе животных). Одновременно обнаружено достоверное повышение концентрации гомоцистеина до $53,5 \pm 8,1$ мкмоль/л ($8,6 \pm 1,4$ мкмоль/л в контрольной группе животных) и статистически значимое снижение концентрации стабильных метаболитов оксида азота и экспрессии eNOS.

Также обнаружено, что на фоне введения метионина наблюдалось резкое снижение адаптационных возможностей миокарда при проведении нагрузочных проб, это свидетельствует о том, что в данной модели имеет место нарушение функции сосудистого эндотелия и метаболизма оксида азота. Примечателен тот факт, что в рамках данного исследования удалось добиться моделирования эндотелиальной дисфункции на фоне нормальных исходных показателей систолического и диастолического артериального давления, что доказывает возможность развития эндотелиальной дисфункции при отсутствии артериальной гипертензии.

Механизм ингибирования выработки NO в случае, использования L-NAME заключается в конкурентном ингибировании фермента eNOS аналогом L-аргинина — L-NNA. L-NAME фактически является пролекарством: в организме этот эфир гидролизуется с участием специальных ферментов — эстераз, давая активный ингибитор — L-NNA. В свою очередь дефицит сосудистого NO вызывает существенные изменения функций системы кровообращения в целом. Эти нарушения включают: снижение эффектов эндотелийзависимых вазодилататоров и повышение вазоконстрикторных влияний, рост АД, нарушения системной и региональной гемодинамики, функций сердца, увеличение экспрессии адгезивных молекул эндотелия, агрегации тромбоцитов; прилипание их и лейкоцитов к сосудистой стенке; пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток с образованием неоинтимы, синтез внеклеточного матрикса и др. [1, 5, 10].

Данные результаты подтверждают и наши исследования. Внутрибрюшинное введение в течение 7 дней крысам-самцам ингибитора фермента eNOS L-NAME приводит к выраженной АГ и эндотелиальной дисфункции. Соответственно АД у животных с патологией составило САД — $190,3 \pm 6,7$, ДАД — $145,0 \pm 3,9$ мм рт.ст., тогда как у интактных животных САД — $137,7 \pm 3,7$, ДАД — $101,9 \pm 4,3$ мм рт.ст.

В результате наших исследований установлено, что L-NAME индуцированная, ADMA — подобная модель эндотелиальной дисфункции приводят к повышению показателей сократимости миокарда. ЛЖД, $+dp/dt$, $-dp/dt$. Значения были достоверно выше соответствующих значений интактных животных, что, вероятно, обусловлено гипертрофией левого желудочка. Кроме того, проба на адренореактивность, нагрузка сопротивлением на 25 секунде пережатия аорты и постгипоксическая реактивность миокарда сопровождались достоверно более высокими значениями ЛЖД и скоростных показателей, что также согласуется с данными по эндотелиальной дисфункции [11, 12].

Результаты определения биохимических маркеров ЭД подтвердили результаты физиологических методов. Так NO-продуцирующая функция эндотелия исследованная на основании данных увеличения экспрессии e-NOS (в процентах от контроля) и содержания нитрит-ионов NOx обнаружила, что моделирование L-NAME индуцированного дефицита NO приводит к резкому снижению экспрессии e-NOS и содержания нитрит-ионов (NOx).

Таким образом, моделирование гомоцистеин индуцированной эндотелиальной дисфункции с помощью внутрижелудочного введения метионина в дозе 3 г/кг 1 раз в сутки в течение 7 дней и моделирование

L-NAME индуцированного дефицита оксида азота с помощью внутрибрюшинного введения L-NAME в дозе 25 мг/кг следует признать адекватными, физиологически обоснованными экспериментальными моделями эндотелиальной дисфункции, которые могут быть использованы для изучения возможностей и путей фармакологической коррекции эндотелий-ассоциированной патологии.

Литература

1. Белоусов, Ю.Б. Эндотелиальная дисфункция как причина атеросклеротического поражения артерий при артериальной гипертензии: методы коррекции / Ю.Б. Белоусов, Ж.Н. Намсараев // Фармацевтика. — 2000. — №6. — С. 62-72.
2. Гурбанов, К.К. Сравнительная оценка антиишемического действия верапамила на разных моделях ишемии миокарда / К.К. Гурбанов, Г.В. Ковалев, А.А. Паперно // Фармакология и токсикология. — 1991. — Т.54, №4. — С. 21-23.
3. Возможности моделирования гипергомоцистеин-индуцированной эндотелиальной дисфункции у крыс / Корокин М. В., Полонская К. В., Покровский М. В. и соавт. // Кубанский научный медицинский вестник. — 2009, — № 5, — С. 43 — 48.



4. Метельская В. А. Клиническая и лабораторная диагностика. – 2004, – № 9, – 86 с.
5. Ольбинская, Л.И. Эндотелиновая агрессия в патогенезе хронической сердечной недостаточности и подходы к её терапевтической коррекции / Л. И. Ольбинская, Ю. И. Найманн // Терапевтический архив – 2005. – №9. – С. 88-93.
6. Методические подходы для количественной оценки развития эндотелиальной дисфункции при L-NAME-индуцированной модели дефицита оксида азота в эксперименте / Покровский М. В., Кочкаров В. И., Покровская Т.Г., и соавт. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2006, – № 10, – С. 72 – 77.
7. Покровский М. В., Покровская Т.Г., Кочкаров В.И. Патент. 2301015 Российская Федерация, МПК7 А61В 5/02. – № 2005113243/14, заявл. 10.1.2006; опубл. 20.06.07, Бюл. № 17. – 7 с.
8. Принципы фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции / Покровский М. В., Артюшкова Е. Б., Покровская Т. Г. и соавт. // Кубанский научный медицинский вестник – 2007, – №1-2, – С. 146 – 150.
9. Эндотелиопротекторные эффекты L-аргинина при моделировании дефицита окиси азота / Покровский М.В., Покровская Т.Г., Кочкаров В.И. и соавт. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008, - № 71 (2), – с. 29 – 31.
10. Angiotensin-converting enzyme inhibitor prevents plasminogen activator inhibitor-1 expression in a rat model with cardiovascular remodeling induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis / M. Katoh, K. Egashira, T. Mitsui et al. // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2000. – Vol. 32. – P. 73 – 83.
11. Ischemic preconditioning prevents endothelial dysfunction, P-selectin expression, and neutrophil adhesion by preventing endothelin and O₂- generation in the post-ischemic guinea-pig heart / M. Duda, E. Czarnowska, M. Kurzelewski et al. // Physiol. Pharmacol. – 2006. – Vol. 57, № 4. – P. 553-569.
12. Palmer, R.M.J. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor / R.M.J. Palmer, A.G. Ferrige, S. Moncada // Nature. – 1987. – Vol. 327. – P. 524–526.

EVALUATION OF THE DYNAMICS OF FUNCTIONAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN MODELING OF HYPERHOMOCYSTEIN AND L-NAME-INDUCED DEFICIENCY OF NITRIC OXIDE.

M.V. KOROKIN
M.V. POKROVSKIY
V.I. KOCHKAROV
O.S. GUDYREV
L.V. KOROKINA
T.G. POKROVSKAYA
V.A. SAVIN

*Belgorod National
Reserch University*

e-mail: mkorokin@mail.ru

We investigate an assessment of functional and biochemical parameters in the modeling of hyperhomocysteinemia and L-NAME - induced nitric oxide deficiency. Found that intragastric administration of methionine at a dose of 3 g/kg intraperitoneal injection of L-NAME at a dose of 25 mg/kg caused various degrees of complex changes in the functional and biochemical indicators of the nitroxidergic system. These models deficit of nitric oxide should recognize appropriate physiologically reasonable experimental models of endothelial dysfunction, which can be used to explore the possibilities and ways pharmacological correction of endothelium-associated pathology.

Keywords: endothelial dysfunction, methionine, L-NAME, hyperhomocysteinemia, ADMA.