

ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

ВЛИЯНИЕ МЕКСИДОЛА И СУЛОДЕКСИДА НА УРОВЕНЬ СПЕЦИФИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РАЗВИТИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ У ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

И. Н. Тюренков, А. В. Воронков, А. А. Слиецанс, Г. Л. Снигур¹

Стрептозотоцин-индуцированный сахарный диабет приводит к развитию эндотелиальной дисфункции, что подтверждается снижением экспрессии эндотелиальной NOS и увеличением экспрессии эндотелина-1, как специфических маркеров эндотелиальных нарушений. Все изучаемые вещества проявили эндотелиопротекторную активность, увеличивая концентрацию eNOS и снижая уровень эндотелина-1. По степени выраженности влияния на eNOS и эндотелин-1: сулодексид превосходит мексидол.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция, экспериментальный сахарный диабет, эндотелин-1, eNOS

ВВЕДЕНИЕ

В основе большинства сердечно-сосудистых заболеваний лежит универсальное звено патогенеза — формирование дисфункции эндотелия [4, 10, 11]. При дисфункции эндотелия наблюдается дисбаланс между продукцией вазоконстрикторов и вазодилататоров.

Известно, NO и простагландин являются наиболее “мощными” из известных вазодилататоров, а эндотелин оказывает не менее “мощное”, но противоположное действие на тонус сосудов и другие функции [8, 9].

Нормально функционирующий эндотелий отличается непрерывной базальной выработкой окиси азота (NO) с помощью фермента эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) [7] из субстрата — L-аргинина [9]. При сахарном диабете наблюдается повышение уровня и экспрессии вазоконстрикторных соединений, в частности, эндотелина-1, а также снижение экспрессии эндотелиальной NO-синтазы, которые являются специфическими маркерами для определения дисфункции эндотелия при различных патологических состояниях, в том числе при сахарном диабете.

Цель исследования — изучить влияние мексидола и сулодексидов на специфические маркеры эндотелиальной дисфункции с помощью иммуногистохимического метода, показать их возможные механизмы эндотелиопротекторного действия при экспериментальном сахарном диабете.

¹ Кафедра фармакологии и биофармации ФУВ (зав. — проф. И. Н. Тюренков); кафедра патологической анатомии, Волгоградский государственный медицинский университет, 400131, Волгоград, ул. Пугачевская, 3.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 90 крысах-самцах Вистар, полученных из питомника лабораторных животных “Столбовая” РАМН (Московская обл.).

Эндотелиальную дисфункцию на всех этапах исследования моделировали экспериментальным сахарным диабетом (ЭСД), индуцированным введением стрептозотоцина (45 мг/кг, однократно, в вену) [1, 5, 6]. Количественное определение глюкозы в крови проводили глюкозооксидазным методом с использованием набора Глюкоза-ФКД (Россия) на спектрофотометре ПЭ-5400В ЭКРОС. В эксперимент отбирали животных с уровнем глюкозы крови 12 ммоль/л и выше. Изучаемые препараты вводили per os, мексидол — в дозе 100 мг/кг, сулодексид (весел дуэф) — 30 ЕВЛ (единицы высвобождения липопроотеидлипазы).

Для гистологического исследования под эфирным наркозом производили забор головного мозга крыс. Материал фиксировали в течение 48 часов в 10 % растворе нейтрального забуференного формалина (рН 7,4). После фиксации материал проводили по общепринятой гистологической методике через батарею спиртов возрастающей концентрации, хлороформ и заливали в парафин.

На роторном микротоме изготавливали серийные срезы толщиной 5–6 мкм. В дальнейшем окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятой гистологической методике (депарафинизация в ксилоле, проводка по спиртам убывающей концентрации до воды, окраска гематоксилином Бёмера, дифференцировка солянокислым спиртом, окраска эозином, проводка по спиртам возрастающей концентрации до абсолютного этанола, просветление в ксилоле, заключение в канадский бальзам).

Для выявления степени функционирования эндотелия мозга в условиях ЭСД и эндотелиопротекторного

действия изучаемых веществ при данной патологии оценивали оптическую плотность экспрессии генов. Для этого использовали моноклональные антитела к эндотелину-1 (Endothelin-1 Receptor (ETA), Clone RJT 24, NCL-L-ETA P (HIER)) и моноклональные антитела к eNOS (Nitric Oxid Synthase, Clone RN5, NCL-NOS-3 F P (HIER)). Визуализацию проводили с помощью непрямого иммунопероксидазного метода с высокотемпературной и ферментной демаскировкой антигенов. Для достоверности полученных результатов применяли позитивные контроли антигенов (лимфатические узлы, печень при недифференцированном лейкозе), негативные контроли антигенов (предстательная железа, головной мозг) и негативные контроли антител (обработка срезов без нанесения первичных антител) [6].

Для анализа морфологических показателей производили микрофотосъемку цифровой камерой Canon (Japan, 5.0 мегапикселей) на базе микроскопа AxioStar plus (Карл Цейс, Германия) с использованием объектива $\times 40$, $\times 100$ и окуляра $\times 10$. Оценивали процентное отношение иммунопозитивных клеток к общему количеству эндотелиальных клеток мозга.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эндотелиальная eNOS-синтаза, образуемая, главным образом, в эндотелии, принимает непосредственное участие в образовании достаточного для физиологической вазодилатации сосудов количества окиси азота. Кроме того, в норме наблюдается баланс между факторами вазоконстрикции и вазодилатации, что может охарактеризовать сниженная экспрессия маркера эндотелиальной дисфункции — эндотелина-1 [3, 4].

Так, в группе интактных крыс по степени экспрессии антигенов иммуногистохимическая картина соответствовала стандартной норме, т.е. выраженное окрашивание к моноклональному антигену Clone RN5 (eNOS), и слабое/умеренное окрашивание к моноклональному антигену Clone RJT (эндотелин-1, табл. 1).

Таблица 1. Результаты исследований, полученные при оценке полуколичественной шкалы иммуногистохимической реакции

| Группа животных | Эндотелин Clone RJT | Эндотелиальная-NOS Clone RN5 |
|------------------|---|------------------------------|
| | Полуколичественная шкала оценки иммуногистохимической реакции | |
| Интактные | + | +++ |
| ЭСД | +++ | + |
| ЭСД + сулодексид | ++ | +++ |
| ЭСД + мексидол | ++ | ++ |

Примечание. Полуколичественная шкала оценки иммуногистохимической реакции: 0 — негативное окрашивание; + — слабое окрашивание; ++ — умеренное окрашивание; +++ — выраженное окрашивание. Здесь и в табл. 2: ЭСД — животные со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом; ЭСД + мексидол или сулодексид — животные со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом и введением изучаемых веществ.

При патологии наблюдается снижение уровня NO, одними из основных причин этого являются нарушения работы eNOS-синтазной системы. В группе животных с моделью стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета (ЭСД) отмечалось слабое окрашивание к моноклональному антигену Clone RN5 (eNOS) иммунопозитивных клеток ГЭБ во всех отделах головного мозга, тогда как в этой же группе животных окрашивание к моноклональному антигену Clone RJT (эндотелин-1) было выраженным (табл. 1). Таким образом, изменения уровней экспрессии маркеров эндотелиальной дисфункции свидетельствуют о выраженных изменениях функции сосудистого эндотелия при сахарном диабете.

При фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции препаратом с антиоксидантным механизмом действия мексидолом и низкомолекулярным гепариноидом сулодексидом были получены следующие результаты. В группах животных с ЭСД, получавших в качестве эндотелиопротекторов мексидол и сулодексид, степень экспрессии антигенов отличалась от групп животных без фармакотерапии и приближалась по степени окрашивания к животным интактной группы (табл. 1).

Полученные данные согласуются с исследованиями ряда авторов, указывающих, что в результате антиоксидантной активности мексидола увеличивается выработка сосудистым эндотелием “мощных” вазодилаторов и, следовательно, происходит вазодилатация ранее стенозированных микрососудов. Таким образом, мексидол способствует нормализации микроциркуляции и восстановлению нормальной функции эндотелия [2].

При оценке оптической плотности уровень экспрессии Clone RN5 (eNOS) в группах животных с ЭСД был в 2,5 раза ($p < 0,05$) ниже, чем у интактных животных.

У животных с ЭСД, получавших сулодексид, уровень оптической плотности экспрессирующих Clone RN5 недостоверно отличался от группы интактных

Таблица 2. Морфометрическая оценка экспрессии эндотелина-1 и эндотелиальной-NOS по оптической плотности у животных с сахарным диабетом и животных, получавших изучаемые соединения

| Группа животных | Эндотелин-1 (Clone RJT) | Эндотелиальная-NOS (Clone RN5) |
|--------------------|--|--------------------------------|
| | Оптическая плотность (единицы яркости) | |
| Контроль интактные | 35,9 ± 3,5 | 86,3 ± 3,2 |
| ЭСД | 79,2 ± 3,6* | 34,4 ± 2,7** |
| ЭСД + сулодексид | 50,2 ± 2,6 [#] | 69,4 ± 2,4 ^{##} |
| ЭСД + мексидол | 50,2 ± 1,9 [#] | 62,8 ± 3,1 ^{##} |

Примечание. Оптическую плотность рассчитывали с помощью программы морфометрического анализа изображений ВидеоТест-Морфо 4.0 (Россия). * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ — достоверно по отношению к группе интактных животных; # — $p < 0,05$; ## — $p < 0,01$ достоверно по отношению к группе животных с сахарным диабетом (критерий Уайта-Вилкоксона).

животных (табл. 2). Незначительно уступали сулодексиду по уровню оптической плотности Clone RN5 результаты, полученные у животных с ЭСД, получавших на фоне экспериментальной патологии мексидол.

Таким образом, влияние мексидола и сулодексида на функцию эндотелия объясняется их способностью влиять непосредственно на систему синтеза и выделения NO (за счет усиления экспрессии и/или активности eNOS, увеличения образования NO), а также за счет снижения экспрессии вазоконстрикторного агента — эндотелина-1.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментальный сахарный диабет сопровождается развитием выраженной дисфункции эндотелия, что подтверждается нарушениями в экспрессии маркеров эндотелиальной дисфункции — eNOS и эндотелина-1.

2. Мексидол и сулодексид вызывают снижение экспрессии эндотелина-1 и усиление активности eNOS, что, очевидно, лежит в основе их эндотелиопротекторного действия. Сулодексид оказал наиболее выраженное эндотелиопротекторное действие.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Г. Баранов, *Экспериментальный сахарный диабет*, Ленинград (1983).
2. Т. А. Воронина, Л. Д. Смирнов, К. М. Дюмаев, *Труды научно-практ. конф. с междунар. участием "Свободные радикалы, антиоксиданты и болезни человека"*, Смоленск (2001), сс. 191 – 193.
3. Н. Н. Петрищев, *Клин. и лаб. диагностика*, № 1, 50 – 52 (2001).
4. Н. Н. Петрищев, *Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция*, Санкт-Петербург (2003), сс. 4 – 38.
5. В. Б. Писарев, Г. Л. Снигур, А. А. Спасов и др., *Вестн. ВолгГМУ*, **33**(10), 38 – 41 (2010).
6. И. Н. Тюренков, А. В. Воронков, А. А. Слиецанс, Е. Г. Доркина, *Бюл. Волгоградского научного центра РАМН*, № 1, 19 – 21 (2009).
7. J. E. Fish, P. A. Marsden, *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 144 – 162 (2006).
8. S. Moncada, *Pharmacol. Rev.*, **30**, 293 – 331 (1978).
9. L. R. Stow, *FASEB J.*, **25**, 16 – 28 (2011).
10. W. W. Tak, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **55**, 300 – 307 (2010).
11. D. Versari, *Diabetes Care*, **32**, 314 – 21 (2009).

Поступила 28.09.11

EFFECTS OF MEXIDOL AND SULODEXIDE ON THE LEVEL OF SPECIFIC MARKERS OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN ANIMALS WITH EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

I. N. Tyurenkov, A. V. Voronkov, A. A. Slietsans, and G. L. Snigur

Pharmacology and Biopharmacy Chair, Department of Postgraduate Medical Training, Anatomic Patology Chair, Volgograd State Medical, ul. Pugachevskaya 3, Volgograd, 400131, Russia

Streptozotocin-induced diabetes leads to the development of endothelial dysfunction, as evidenced by decreased expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and increased expression of endothelin-1 as specific markers of endothelial disorders. All test substances showed endothelioprotective activity by increasing the concentration of eNOS and reducing the level of endothelin-1. With respect to the degree of impact on the eNOS and endothelin-1 levels, the compounds studied can be rated as follows: sulodexide > mекsидол.

Key words: Endothelial dysfunction, experimental diabetes, endothelin-1, endothelial nitric oxide synthase (eNOS)

