

**М. В. ПОКРОВСКИЙ, В. И. КОЧКАРОВ, Т. Г. ПОКРОВСКАЯ,
М. П. ГЛАДЧЕНКО, Е. Б. АРТЮШКОВА, Е. Н. ПАШИН, М. В. БРУСНИК,
Т. Н. ЧУЛЮКОВА, Ю. П. КЛЯВС, М. М. КОРНЕЕВ, Т. И. ЗЕЛЕНКОВА,
В. А. МАЛЫХИН, А. С. БЕЛОУС, Я. И. ЗАЛОЗНЫХ, А. И. МАЯКОВ**

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ РАЗВИТИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ L-NAME-ИНДУЦИРОВАННОЙ МОДЕЛИ ДЕФИЦИТА ОКСИДА АЗОТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

*Кафедра фармакологии государственного образовательного учреждения
высшего профессионального образования «Курский государственный медицинский университет
Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»*

Эндоthелиальные клетки сосудистого русла, осуществляя синтез локально действующих медиаторов, морфофункционально ориентированы на оптимальное регулирование органного кровотока [5, 12, 14]. Оксид азота (NO) – ведущий гуморальный эндоthелиальный модулятор дилатации, релаксирующий сосуды, который вырабатывается эндоthелиоцитами [3, 4, 15]. Как известно, NO синтезируется из L-аргинина под влиянием NO-синтазы путем присоединения молекулярного кислорода к конечному атому азота гуанидиновой группы L-аргинина [7, 10, 11]. Дефицит NO приводит к развитию эндоthелиальной дисфункции, выражающейся в аномальной сосудистой реактивности, что является одним из ведущих патогенетических факторов развития артериальной гипертонии, атеросклероза, сахарного диабета и их осложнений [2, 6, 13].

Целью настоящего исследования является разработка комплекса методических подходов для оценки степени эндоthелиальной дисфункции при моделировании дефицита оксида азота с использованием результатов функциональных проб, биохимических маркеров и результатов морфологических исследований.

Методика исследования

Моделирование дефицита оксида азота проводилось на белых крысах-самцах линии Wistar массой 250–300 г. N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) (неселективный блокатор NO-синтазы) вводился ежедневно один раз в сутки внутривенно в дозе 25 мг/кг. На 7-й день от начала эксперимента под наркозом (этамивал-натрия 50 мг/кг) вводили катетер в левую сонную артерию для регистрации показателей, болюсное введение фармакологических агентов осуществляли в правую бедренную вену. Показатели гемодинамики: систолическое артериальное давление (САД), диастолическое артериальное давление (ДАД), среднее артериальное давление (Ср АД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) – измеряли непрерывно посредством датчика и компьютерной программы “Bioshell”. Функциональные пробы: внутривенное введение ацетилхолина (40 мкг/кг) [13] и нитропруссид натрия (30 мкг/кг) [3].

Для оценки биохимических маркеров эндоthелиальной дисфункции использована модификация метода определения стабильных метаболитов NO, позволяющая после депротеинизации сыворотки крови проводить одноэтапное количественное определение сум-

марных нитратов и нитритов [8]. Принцип метода заключается в одновременном восстановлении нитратов в нитриты в присутствии хлористого ванадия и реакции диазотирования с последующим развитием окраски. Уровень экспрессии эндоthелиальной синтазы оксида азота (e-NOS) определяли в клеточном лизате по методу R. J. Hendrickson [9] с небольшими модификациями. Детекцию полосы eNOS проводили методом усиленной хемолюминесценции (ECL). После отмывки в фосфатном буфере 7 раз по 10 мин мембрану обрабатывали соответствующим раствором (ECL, Amersham), как указано производителем, экспонировали на пленку Hyperfilm-ECL (Amersham UK) в течение 2 ч в темноте. Полоску, соответствующую eNOS, детектировали в соответствии с ее молекулярной массой, устанавливаемой по сравнению с белками-метками. Пленку высушивали на воздухе, полосы сканировали и рассчитывали площадь под кривой с использованием программы Total Lab.

Для морфологического подтверждения развития моделируемых патологических процессов и в комплексной оценке эффективности препаратов проведено гистологическое исследование сердца, почек, головного мозга. Материал фиксирован в 10%-ном формалине с последующей заливкой в парафин. Используются окраски гематоксилином Рого и эозином для выявления ранних повреждений миокардиоцитов, по Ван Гизон, ставилась ШИК-реакция. При морфометрии сердца использован метод раздельного взвешивания миокарда с определением желудочкового индекса и диаметра кардиомиоцитов по методике Г. Г. Автандилова [1]. В почках оценивались диаметр, состояние почечных телец, канальцев и артериол.

Результаты исследования

Основным недостатком сравнительной, количественной оценки функциональных сосудистых проб является то, что степень снижения в абсолютных цифрах определяется исходным уровнем артериального давления. Сравнение показателей абсолютных значений снижения САД, ДАД, Ср АД, а также динамика ЧСС при проведении функциональных проб ЭЗВД с АХ выявили достоверные различия в абсолютных значениях показателей АД между собой. Однако вследствие развития значительной артериальной гипертонии при данной экспериментальной модели эндоthелиальной дисфункции степень снижения

абсолютных показателей АД при проведении ЭЗВД с АХ не выявляет объективную оценку вклада именно нарушения продукции оксида азота (таблица).

Более того, функциональная проба с введением ацетилхолина помимо сосудистого компонента имеет выраженный кардиальный компонент (брадикардия, снижение сердечного выброса), что не позволяет использовать точку максимального снижения артериального давления для оценки действия препаратов, имеющих холинергическую активность.

На рисунках 1, 2 изображена динамика АД при проведении функциональной пробы эндотелийнезависимой вазодилатации с введением нитропруссид в дозе 30 мкг/кг у интактных животных и животных с L-NAME-индуцированным дефицитом оксида азота.

При оценке результатов функциональной пробы на эндотелийзависимую вазодилатацию (ЭЗВД) с введением ацетилхолина 40 мкг/кг нами использована площадь треугольника над кривой восстановления АД. При этом за меньший из катетов данного треугольника принималась разность между точкой окончания кардиального компонента и точкой восстановления артериального давления после сосудистой реакции (рис. 1).

При оценке результатов функциональной пробы эндотелийнезависимой вазодилатации (ЭНВД) с введением нитропруссид в дозе 30 мкг/кг использовали также площадь треугольника над кривой восстановления артериального давления. Точками меньшего катета являлись точка максимального падения артериального давления при сосудистой реакции и точка выхода уровня артериального давления на «плато» (рис. 2).

Большими катетами в этих треугольниках являлись показатели времени восстановления сосудистой реакции на введение ацетилхолина и нитропруссид, выражаемое в секундах. Площадь исчисляемых треугольников выражали в мм рт. ст. х сек.

У интактных животных обработка результатов серий экспериментов показала, что болюсное внутривенное введение ацетилхолина в течение 3–5 сек. приводило к резкому падению артериального давления,

достигающего пика у интактных животных для систолического давления (САД) – $75,0 \pm 4,4$ мм рт. ст., для диастолического давления (ДАД) – $39,7 \pm 2,9$ мм рт. ст. и для среднего артериального давления (СрАД) – $59,9 \pm 2,9$ 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. Именно эта площадь треугольника нами принималась за сосудистый компонент ЭЗВД на АХ и использовалась для дальнейших расчетов и составляла $1268,0 \pm 74,8$ в мм рт. ст. х сек. (таблица).

Эндотелийнезависимая вазодилатация (ЭНВД) также характеризовалась снижением САД до $81,8 \pm 8,1$, ДАД до $57,4 \pm 6,9$ и СрАД до $61,0 \pm 3,0$ мм рт. ст. с последующим полным восстановлением АД в среднем в течение $45,1 \pm 1,0$ сек. При этом площадь треугольника над кривой восстановления, используемая нами в дальнейших расчетах, составляла $1375,3 \pm 93,7$ в мм рт. ст. х сек. Моделирование эндотелиальной дисфункции приводило к достоверному снижению площади над реакцией восстановления АД при проведении ЭЗВД до $695,3 \pm 87,6$ мм рт. ст. х сек. по сравнению с интактной группой животных (рис. 1). Напротив, ЭНВД увеличилась у животных с блокадой NO-синтазы по сравнению с интактными до $3322,7 \pm 116,7$ мм рт. ст. х сек. (рис. 2).

Такая принципиальная разница в ЭЗВД и ЭНВД реактивности интактных животных и животных с блокадой NO-синтазы (L-NAME -зависимой) закономерно привела нас к необходимости введения показателя, отражающего степень эндотелиальной дисфункции (далее – коэффициент эндотелиальной дисфункции) – КЭД, являющегося отношением площади ЭНВД восстановления АД в ответ на введение НП к площади ЭЗВД восстановления АД в ответ на введение АХ (таблица).

$$\text{КЭД} = \frac{S_{\text{АД НП}}}{S_{\text{АД АХ}}}$$

Мы рассчитывали КЭД у каждого животного интактной группы и группы с моделированием блокады

Таблица 1

Динамика показателей артериального давления, частоты сердечных сокращений и коэффициента эндотелиальной дисфункции при моделировании эндотелиальной дисфункции введением N-нитро-L-аргининметилового эфира (25 мг/кг внутрибрюшинно однократно в течение 7 дней) ($M \pm m$, $n=10$)

Группы животных	Функциональная проба	САД	ДАД	ЧСС	S	КЭД
Интактные	Исходные	$137,7 \pm 3,7$	$101,9 \pm 4,3$	$453,8 \pm 11,6$		$1,1 \pm 0,1$
	Ацетилхолин	$84,3 \pm 4,5$	$38,7 \pm 2,8$	$448,3 \pm 11,0$	$1268,0 \pm 74,8$	
	Нитропруссид	$83,0 \pm 3,7$	$42,1 \pm 4,4$	$464,1 \pm 11,5$	$1375,3 \pm 93,7$	
Получавшие N-нитро-L-аргининметилового эфира	Исходные	$190,3 \pm 6,7$	$145,0 \pm 3,9$	$417,2 \pm 11,7$		$5,4 \pm 0,6^*$
	Ацетилхолин	$110,6 \pm 5,2^*$	$82,8 \pm 6,6^*$	$399,8 \pm 15,6$	$695,3 \pm 87,6^*$	
	Нитропруссид	$88,7 \pm 4,7$	$50,8 \pm 4,2$	$401,7 \pm 11,8$	$3322,7 \pm 116,7^*$	

Примечание: САД – систолическое артериальное давление (мм рт. ст.),

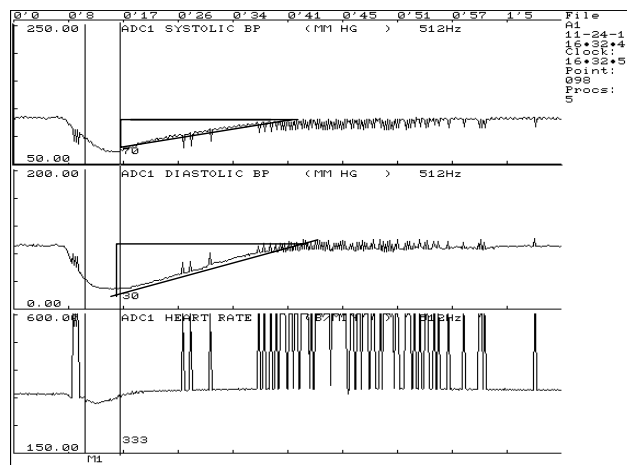
ДАД – диастолическое артериальное давление (мм рт. ст.),

ЧСС – частота сердечных сокращений (уд. в мин);

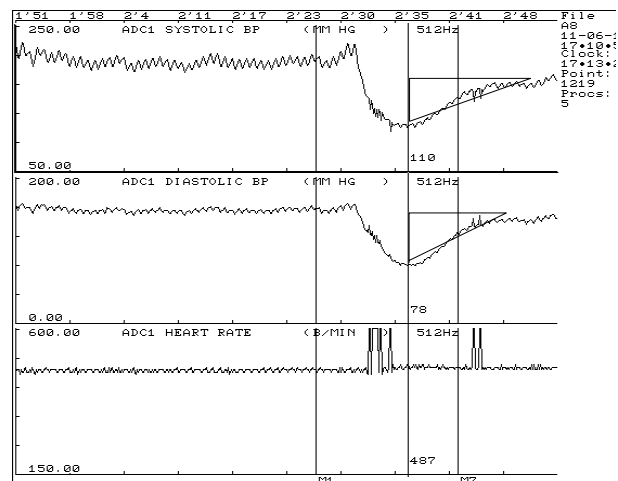
S – площадь над кривой восстановления среднего артериального давления после проведения функциональных проб (мм рт. ст. х сек.);

КЭД – коэффициент эндотелиальной дисфункции (усл. ед) – отношение площади над кривой реакции среднего артериального давления на введение нитропруссид (НП) 30 мкг/кг и ацетилхолина (АХ) 40 мкг/кг,

* – $p < 0,05$ – по сравнению с интактными.



а



б

Рис. 1. Кривые САД, ДАД, ЧСС при проведении функциональной пробы на эндотелийзависимую вазодилатацию (внутривенное введение ацетилхолина 40 мкг/кг) у intactных животных (а) и у животных при моделировании эндотелиальной дисфункции введением N-нитро-L-аргининметилового эфира (б)

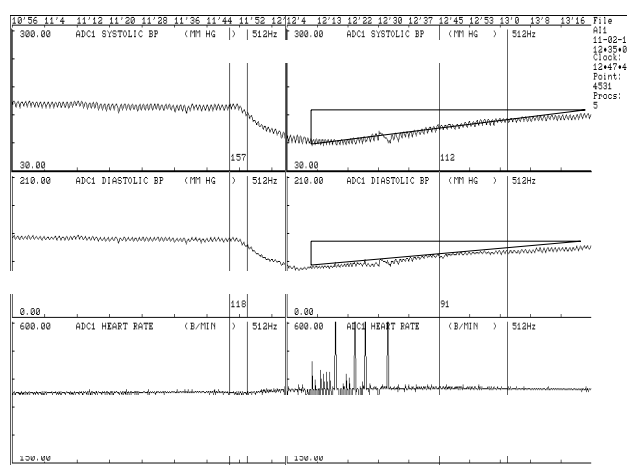
Примечание: здесь и далее САД – систолическое артериальное давление (мм рт. ст.);
ДАД – диастолическое артериальное давление (мм рт. ст.);
ЧСС – частота сердечных сокращений (уд. в мин);
треугольники над кривой артериального давления – объяснение по тексту.

NO-синтазы, при этом получена разница КЭД в 5 раз: соответственно 1,1 – у intactных и 5,4 – у животных, получавших L-NAME.

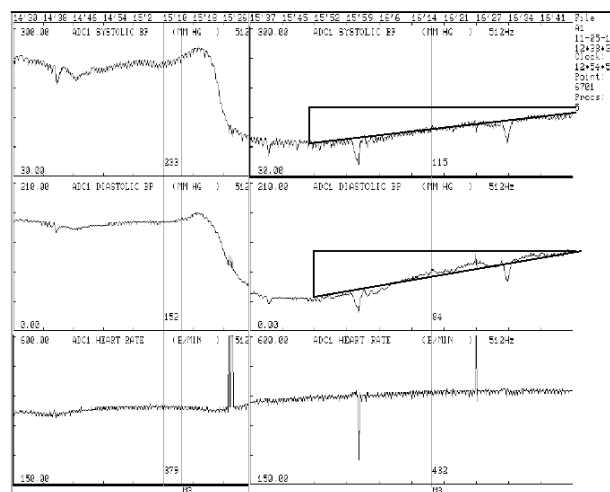
При оценке NO-продуцирующей функции эндотелия обнаружено, что моделирование L-NAME-индуцированного дефицита NO приводило к резкому снижению экспрессии e-NOS и содержанию нитрит-ионов (NO_x), соответственно в 3,5 и 1,9 раза (рис. 3).

Таким образом, результаты биохимических исследований подтвердили показательность и адекватность выбранной модели дефицита оксида азота.

Изменения, характерные для артериальной гипертензии при L-NAME-индуцированном дефиците оксида азота, выявлены и при морфологическом исследовании сердца, почек. На 7-е сутки эксперимента наблюдались выраженные изменения миокарда. Сердце макроскопически с плотными стенками, прирост



а



б

Рис. 2. Кривые САД, ДАД, ЧСС при проведении функциональной пробы на эндотелийнезависимую вазодилатацию (внутривенное введение нитропрусида 30 мкг/кг) у intactных животных (а) и у животных при моделировании эндотелиальной дисфункции введением N-нитро-L-аргининметилового эфира (б)

Примечание: треугольники над кривой артериального давления – объяснение по тексту.

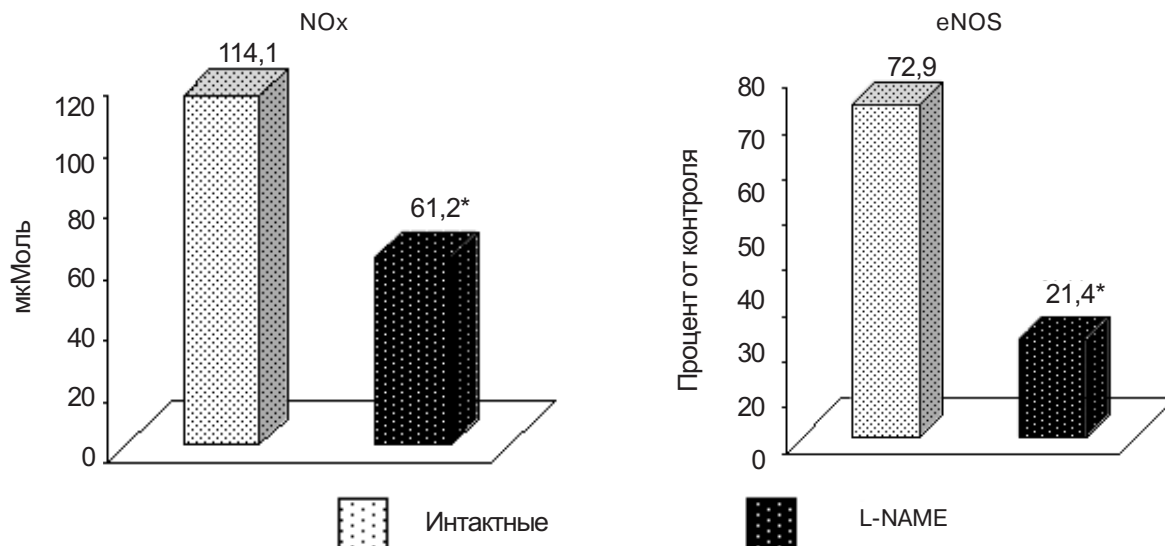


Рис. 3. Концентрация нитрит-ионов (NOx) в сыворотке крови интактных животных и животных с моделированием дефицита оксида азота введением L-нитро-аргининметилового эфира (L-NAME) в дозе 25 мг/кг внутрибрюшинно (в мкм) и показатели экспрессии e-NOS под влиянием сыворотки интактных крыс и крыс с моделированием дефицита оксида азота введением L-нитро-аргининметилового эфира (L-NAME) в дозе 25 мг/кг внутрибрюшинно (в процентах от контроля)

Примечание: * – $p < 0,05$ – по сравнению с интактными животными.

относительной массы в сравнении с контролем составил 26,6%. Показатели желудочкового индекса при раздельном взвешивании варьировали от 0,33 до 0,54, не отличаясь от таковых в контроле ($p < 0,05$), что в совокупности с увеличением массы сердца свидетельствует о равномерной гипертрофии стенок его желудочков. В сердце отмечена гипертрофия кардиомиоцитов левого желудочка до $18,5 \pm 0,9$ (в норме $12,1 \pm 0,2$ мкм, $p < 0,05$) (рис. 4).

При окраске гематоксилином Рего выявлялись очаговые сегментарные или тотальные повреждения кардиомиоцитов контрактурного типа, выраженные диффузные изменения почечных телец в виде сморщивания, гиалиноза и склероза, спастическое состояние артериол, дезориентация эндотелиоцитов, гиалиноз и склероз стенки артерий. Эпителий канальцев уплощен, на значительных участках десквамирован. Практически все канальцы заполнены плотными гиалиновыми цилиндрами (рис. 5).

В головном мозге отмечены очаговые изменения в виде полнокровия сосудов оболочек, спастических изменений мелких артерий, проявлявшихся гофрированностью интимы, сужением просвета, очагов периваскулярного отека.

Комплекс изменений в сердце, головном мозге и почках позволяет оценить их как соответствующие периоду стойкого повышения артериального давления с развитием поражения сосудов.

Таким образом, результаты гистологических исследований обнаружили, что моделирование L-NAME-индуцированного дефицита NO на 8-е сутки приводит к яркой гипертрофии миокардиоцитов, утолщению мышечного слоя сосудистой стенки и спазму артериол, наиболее выраженному в почечных артериях, а также дезориентации («вздыбливанию») эндотелиоцитов.

Таким образом, вышеизложенное свидетельствует о том, что длительное, в течение 7 суток, внутри-

брюшинное введение L-NAME в дозе 25 мг/кг вызывает у лабораторных животных комплекс функциональных, биохимических и морфологических изменений, связанных с развитием дефицита NO, вследствие блокады NO-синтазы. В частности, на 8-е сутки развивались выраженная гипертензия и эндотелиальная дисфункция, резко уменьшился уровень нитрит-ионов и экспрессия eNOS. Гистологически обнаруживалась гипертрофия миокарда и мышечного слоя сосудистой стенки. Описанный симптомокомплекс клинически можно сопоставить со злокачественной гипертензией. Приведенные результаты наглядно демонстрируют, что для оценки эндотелиальной дисфункции, вызванной L-NAME-индуцированным дефицитом оксида азота, предлагаемый нами коэффициент отношения площади над кривой реакции восстановления артериального давления после введения нитропрусида к площади над кривой реакции восстановления артериального давления после введения ацетилхолина является достаточно показательным и информативным. Данный коэффициент, названный нами коэффициентом эндотелиальной дисфункции (КЭД), позволяет оценивать степень эндотелиальной дисфункции при моделировании ее различными способами, а также эндотелиопротективные эффекты различных сердечно-сосудистых средств.

Поступила 07.11.2006

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г. Г. Основы патолого-анатомической практики. М.: РМАПО, 1994. 512 с.
2. Брошусь В. В. Оксид азота как регулятор защитных и гомеостатических реакций организма // Укр. ревматол. журн. 2003. № 4. С. 3–11.
3. Галаган М. Е., Широколова А. В., Ванин А. Ф. Гипотензивное действие оксида азота, продуцируемого из экзо- и эндогенных источников // Вопр. мед. химии. 1991. Т. 37, № 1. С. 67–70.

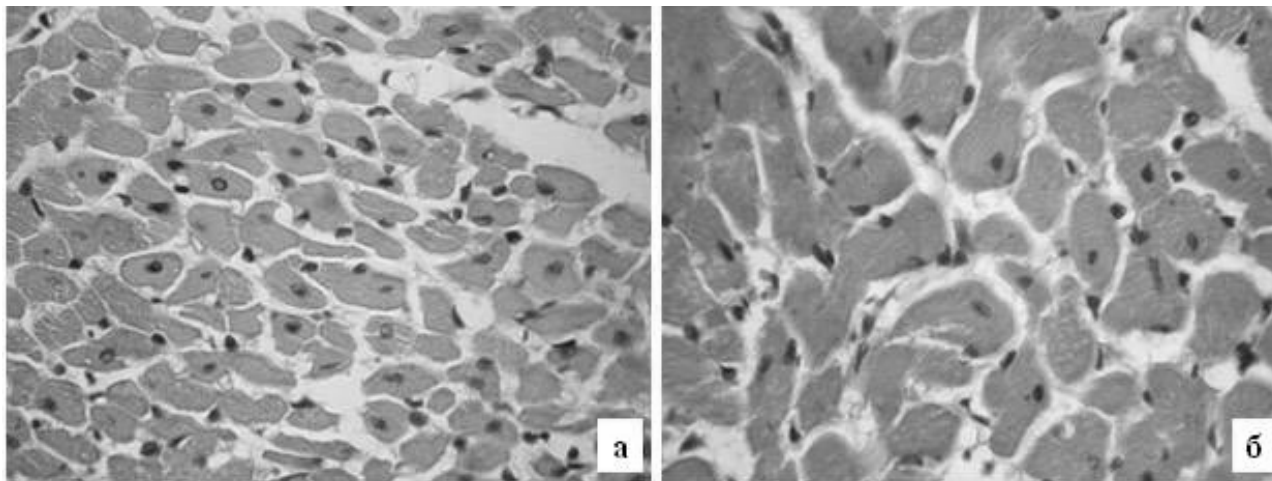


Рис. 4. Морфология миокарда у intactных и опытных животных:

а – гистологическая картина миокарда у intactных крыс на поперечном срезе;

б – гипертрофия кардиомиоцитов и их ядер у крысы с артериальной гипертензией

в модели с L-NAME на поперечном срезе. Окр. гематоксилином и эозином. а, б – х 440

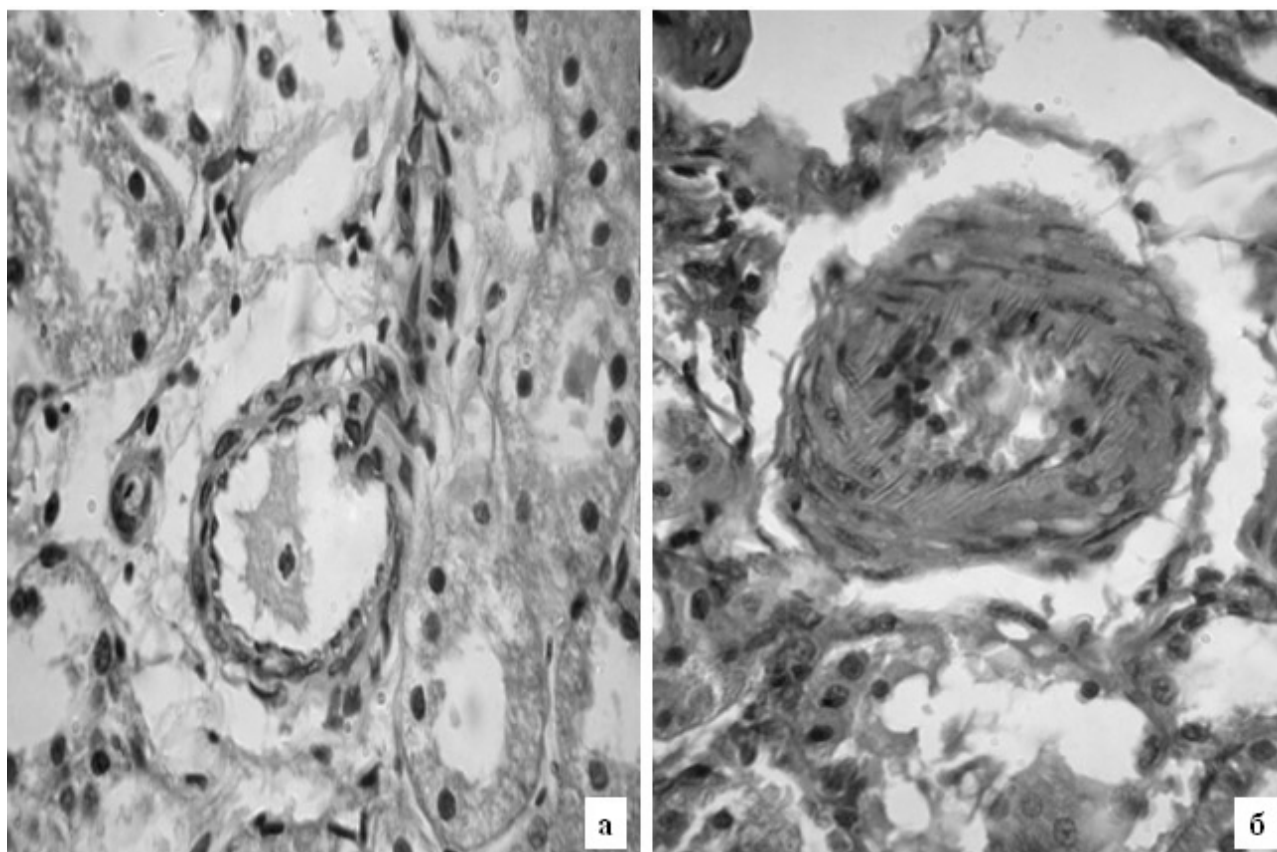


Рис. 5. Морфологическая картина почечных артерий у intactных и опытных животных:

а – неизменная артерия почки у intactной крысы;

б – перестройка стенки почечной артерии с резким утолщением ее стенки и сужением просвета, гиперплазией эластических структур и гипертрофией гладкомышечных элементов у крысы с артериальной гипертензией в модели с L-NAME .

Окр. гематоксилином и эозином, а, б – х 440

4. Граник В. Г., Рябова С. Ю., Григорьев Н. Б. Экзогенные доноры оксида азота и ингибиторы его образования (химический аспект) // Успехи химии. 1997. Т. 66, № 8. С. 792–807.

5. Затеишкова А. А., Затеишиков Д. А. Эндотелиальная регуляция сосудистого тонуса: методы исследования и клиническое значение // Кардиология. 1998. Т. 38, № 9. С. 68–80.

6. Зодионченко В. С., Адашева Т. В., Сандомирская А. П. Дисфункция эндотелия и артериальная гипертензия: терапевтические возможности // Рус. мед. журн. 2002. № 1. С. 11–15.

7. Манухина Е. Б., Лямина Н. П., Долотовская П. В. и др. Роль оксида азота и свободных радикалов в патогенезе артериальной гипертензии // Кардиология. 2002. Т. 42, № 11. С. 73–84.

8. Метельская В. А. Возможности лабораторной оценки NO-продуцирующей функции эндотелия // Клинич. и лаб. диагностика. 2004. № 9. С. 86.

9. Метельская В. А., Гуманова Н. Г., Литинская О. А. и др. Характеристика биохимических маркеров функции сосудистого эндотелия: разработка модельной системы с применением клеточных культур // Вопр. биол. медицины и фарм. химии. 2004. № 2. С. 34–39.

10. Минушкина Л. О., Затеишиков Д. А., Сидоренко Б. А. Генетические аспекты регуляции эндотелиальной функции при гипертензии // Кардиология. 2000. № 3. С. 68–76.

11. Gokce N. L-arginine and hypertension // J. Nutr. 2004. V. 134 (10 Suppl). P. 2807–2811; discussion 2818–2819.

12. Kelm M. The L-arginine-nitric oxide pathway in hypertension // Curr. Hypertens. Rep. 2003. V. 5 (1). P. 80–86.

13. Liauder L., Soriano F. G., Szabo C. Biology of nitric oxide signaling // Crit. Care. Med. 2000. V. 28. P. 37–52.

14. Sainani G. S. V. G. Maru Role of endothelial cell dysfunction in essential hypertension // J. Assoc. Physicians. India. 2004. V. 52. P. 966–969.

15. Shimokawa H. Endothelial dysfunction in hypertension // J. Atheroscler. Thromb. 1998. V. 4. P. 118–227.

**M. V. POKROVSKII,
V. I. KOCHKAROV, T. G. POKROVSKAJA,
M. P. GLADCHENKO, E. B. ARTJUSHKOVA,
E. N. PASHIN, M. V. BRUSNIK,
T. N. CHULUKOVA, J. P. KLJAVS,
M. M. KORNEEV, T. I. ZELENKOVA,
V. A. MALYHIN, A. S. BELOUS,
J. I. ZALOZNYH, A. I. MAJAKOV**

METHODICAL APPROACHES FOR THE QUANTITATIVE ESTIMATION OF DEVELOPMENT ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AT L-NAME-THE INDUCED MODEL OF DEFICIENCY OF NITRIC OXIDE IN EXPERIMENT

The factor of endothelial dysfunction offered by us (FED), allows to estimate a degree of endothelial dysfunction at modelling deficiency nitric oxide, that correlates with biochemical (depression of the contents nitrite-ions and expressions eNOS) and morphological (augmentation of diameter of cardiomyocytes, a spastic stricture, a thickening of a muscular layer and a desorientation of endotheliocytes of renal arterioles) markers.

Key words: endothelial dysfunction, N-nitro-L-arginine methyl aether, nitrite-ions, endothelial nitric oxide synthase, morphological markers.

**Т. Ю. ПРИВАЛОВА, В. П. КРЫЛОВ,
С. Г. ПАВЛЕНКО, С. В. ЕГОРОВА**

МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКИЙ ДИСБАЛАНС ТОЛСТОЙ КИШКИ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ ПОЖИЛОГО И СТАРЧЕСКОГО ВОЗРАСТА

**Российский центр функциональной хирургической гастроэнтерологии,
Кубанский государственный медицинский университет**

Пожилым и старческим возрастом является одним из основных факторов риска в возникновении злокачественных опухолей [6]. Частота встречаемости колоректального рака (КРР) на 100 тысяч населения составляет 11,6 у мужчин и 9,2 у женщин [7]. Около 58% смертей от колоректального рака регистрируется в возрасте старше 75 лет [11]. При этом у таких больных наблюдаются различные сопутствующие заболевания, поэтому большинство из них нуждается в адекватной предоперационной подготовке [10].

Микроэкологические аспекты течения КРР в настоящее время изучены слабо, в то время как роль микрофлоры толстой кишки в обеспечении ряда физиологических функций организма является очевидной [8]. Особый интерес представляют патогенетические взаимосвязи между дисбиозом толстой кишки и прогрессированием онкологического процесса.

С возрастом в органах ЖКТ появляются морфологические и функциональные нарушения, развиваются атрофические изменения эпителия, снижается количество слюны, секрета слизистой оболочки пищевода, желудка, изменяется моторная функция желудочно-кишечного тракта. Возникают изменения и в микробиоценозе кишечника. На фоне ослабления основной микрофлоры при старении организма значительно увеличивается количество гнилостной и пиогенной флоры. Исходя из вышеизложенного, **целью настоящей работы** явилась оценка распространенности и глубины микроэкологического дисбаланса у больных колоректальным раком пожилого и старческого возраста.

Методика исследования

В работе использованы результаты обследования 180 больных КРР пожилого и старческого возраста