

УДК 577.352.3

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ АФОБАЗОЛА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГИСТОПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ У КРЫС

С.Г. Дзугкоев¹, К.М. Козырев², Н.Г. Гуманова³, Ф.С. Дзугкоева^{1}*

¹УРАН Институт биомедицинских исследований Владикавказского научного центра
РАН и Правительства РСО-Алания, ул. Пушкинская, 40, 362019 Владикавказ,
РСО-Алания; тел.: (8901)497-20-14; эл. почта: fira-belikova@mail.ru

²ГОУ ВПО Северо-Осетинская Государственная медицинская академия
Росздрава ФГУ

³«ГНИЦ профилактической медицины» Минздравсоцразвития России

На фоне окислительного стресса при экспериментальном сахарном диабете (ЭСД) у крыс развивается эндотелиальная дисфункция, биохимическими маркерами которой являются повышение концентрации малонового диальдегида (МДА) в крови, нарушение антиоксидантной защиты (АОЗ) клеток, снижение концентрации суммарных метаболитов NO и экспрессии эндотелиальной NO-синтазы (eNOS). Биохимические изменения были сопряжены с гистопатоморфологическими нарушениями эндотелия аорты. Лечение афобазолом способствовало угнетению свободно-радикального окисления, повышению активности супероксиддисмутазы (СОД) и концентрации суммарных метаболитов NO и уровня экспрессии eNOS, а также восстановлению гистологической картины эндотелия аорты, вследствие активации ядерно-цитоплазматических регенераторных процессов.

Ключевые слова: экспериментальный сахарный диабет, перекисное окисление липидов, оксид азота, экспрессия eNOS, гистология, афобазол.

ВВЕДЕНИЕ. Сахарный диабет (СД) характеризуется системными метаболическими расстройствами, в механизме развития которых важную роль играет активация свободно-радикального окисления мембранных фосфолипидов (ФЛ) [1]. Окислительный стресс ассоциируется со снижением биодоступности оксида азота (NO), что в значительной мере может быть связано с разобщением субъединиц фермента и его переключением с преимущественной продукции оксида азота на образование активных форм кислорода (АФК) [2], которые, в свою очередь, инактивируют оксид азота и способствуют нарушению функциональной активности эндотелия, лежащего в основе сосудистых осложнений СД [3-5]. Все вышеизложенное даёт основание полагать, что необходимой составляющей оптимизации патогенетической терапии

* - адресат для переписки

ВЛИЯНИЕ АФОБАЗОЛА НА ФУНКЦИЮ ЭНДОТЕЛИЯ У ДИАБЕТИЧЕСКИХ КРЫС

сосудистых осложнений СД является поиск и испытание новых препаратов, обладающих способностью модулировать продукцию NO и ингибировать свободнорадикальное окисление. В последние годы в литературе появились данные о новом препарате афобазоле (2-[2-(морфолино)этилтио]-5-этоксibenзимидазола гидрохлориде), синтезированном в ГУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, который оказывает противоишемическое действие через σ_1 -рецепторы [6, 7], защищая клетку от свободнорадикальной агрессии [8-10]. Не исключено, что подавление свободнорадикального окисления обусловлено способностью агонистов σ_1 -рецепторов уменьшать активность индуцибельной NO-синтазы (iNOS), которая рассматривается как один из основных “медиаторов” повреждения ишемизированных кардиомиоцитов. Возможно, подавление агонистами σ_1 -рецепторов активности iNOS способствует увеличению синтеза кардиомиоцитом конститутивной NO-синтазы - eNOS, которая способствует защите клетки миокарда от свободнорадикального повреждения [11, 12]. Вместе с тем, для подтверждения антиоксидантных свойств афобазола представляет научный интерес исследования влияния афобазола на показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ), метаболизма NO и гистопатоморфологические показатели при экспериментальном сахарном диабете (ЭСД).

Цель исследования: изучить влияние афобазола на биохимические и гистопатоморфологические показатели эндотелиальной дисфункции у крыс с ЭСД.

МЕТОДИКА. Исследование проведено на 70 крысах-самцах линии Вистар одной возрастной группы (10-14 мес.), массой 220-250 г. Содержание крыс в виварии и проведение экспериментов соответствовали “Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных”, разработанным и утверждённым МЗ СССР (1977 г.), а также принципам Хельсинкской декларации (2000 г.).

Контрольную группу составили интактные животные (n=20), по возрасту и массе сопоставимые с основной группой. Аллоксановый диабет моделировали введением 5% водного раствора аллоксана в дозе 15-18 мг/100 г массы животного на фоне 24-48-часового голодания. Развитие ЭСД контролировали по уровню глюкозы крови и концентрации гликированного гемоглобина (HbA_{1c}), которые определяли колориметрически, используя тест-наборы фирмы “Лахема” (Чехия). Модель считалась состоявшейся при повышении уровня глюкозы крови. Животных брали в опыт по окончании остротоксического периода действия аллоксана, т.е. спустя 14 дней с момента развития ЭСД.

Подопытные крысы были разбиты на следующие группы:

1. контрольная группа – интактные крысы (n=20);
2. крысы с ЭСД без лечения (n=20);
3. крысы с ЭСД, получавшие в течение 30 дней афобазол в дозе 10 мг/кг (n=30).

По окончании эксперимента под тиопенталовым наркозом у крыс забирали кровь из сердца, в гемолизате эритроцитов, определяли концентрацию малонового диальдегида (МДА) в реакции с тиобарбитуровой кислотой в условиях инициации ПОЛ с Fe²⁺ [13]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) в эритроцитах и сыворотке крови определяли методом аутоокисления адреналина, а каталазы по способности пероксида водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс [14]; концентрацию церулоплазмينا по окислению *n*-фенилендиамина [15] и суммарных метаболитов NO в присутствии хлористого ванадия в реакции деазотирования сульфаниламида [16]. Исследуемые органы (почки, печень, сердце) гомогенизировали на холоду в 0,1 М трис (рН 7,4) (1:9) с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 1060 g. Определение концентрации МДА производили в надосадочной жидкости. Уровень экспрессии eNOS в эндотелии аорты определяли как описано в работе [17]. Аорты извлекали, промывали физиологическим раствором и помещали в пластиковые пробирки, которые хранили в жидком азоте. Затем аорты перетирали с жидким азотом в фарфоровой ступке, переносили в микроцентрифужную пробирку, трижды промывали фосфатным буфером (рН 7,4) и собирали осадок после

центрифугирования (10 мин при 1000 g) в 100 мкл лизирующего буфера следующего состава: 0,1 М ацетат Na, pH 6,8, 5 mM ЭДТА, 3% додецилсульфат Na (DCH), центрифугировали при 1000 g 5 мин и подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии DCH. В лунку наносили 20 мкг белка. На каждую пластину наносили смесь предварительно окрашенных белков-метчиков с диапазоном молекулярной массы (М.м.) 7000-200000 Да (Bio-Rad Kaleidoscope Prestained Standards), что позволяло идентифицировать полосу, соответствующую eNOS (М.м 140000 Да). Белок в клеточном лизате определяли по методу Lowry с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта. По окончании электрофореза осуществляли перенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану – Вестерн-блот (60 В, 1 ч). После трёхкратной отмывки мембраны 5 mM фосфатным буфером pH 7,4, содержащим 150 mM NaCl и 0,05% твин-200, её в течение ночи обрабатывали раствором поликлональных кроличьих антител против eNOS человека (“BD Transduction Labs”, США), разведённых в соотношении 1:500 в фосфатном буфере, содержащем 0,1% азид натрия. Затем мембрану отмывали 7 раз по 10 мин в том же буфере. В течение часа мембрану инкубировали с разведёнными в соотношении 1:300 вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (goat anti-rabbit IgG antibodies, “Sigma”, США). При этом неспецифическое связывание конъюгата блокировали добавлением в буфер 5% обезжиренного сухого молока. После отмывки в фосфатном буфере (7 раз по 10 мин) мембрану обрабатывали соответствующим раствором (ECL, “Amersham”, Великобритания), как указано производителем, экспонировали на плёнку Hyperfilm-ECL (“Amersham”) в течение 2 ч в темноте. Полосу, соответствующую eNOS, детектировали в соответствии с её молекулярной массой, устанавливаемой по сравнению с белками-метчиками. Плёнку высушивали на воздухе, полосы сканировали и рассчитывали площадь под кривой с использованием программы Total Lab. Результаты представляли в условных единицах как отношение интенсивности полосы X к интенсивности полосы, принятой за контроль на каждой плёнке. Аорта экспериментальных крыс подвергалась гистологическому исследованию микроскопически. Количественную оценку патогистологических изменений проводили по методу Автандилова [18] с помощью цифрового фотоаппарата “Nikon”, совмещённого с микроскопом.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel 2003. Результаты представлены в виде среднего значения и ошибки среднего. Статистическую достоверность различий между двумя группами животных проверяли с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Исследования проведены на контрольных крысах (1 группа), крысах с ЭСД без лечения (2 группа) и крысах с ЭСД, получавших в течение 30 дней афобазол по 10 мг/кг ежедневно парентерально (3 группа). Данные показали, что у крыс 2 группы глюкоза крови повысилась с $4,66 \pm 0,03$ ммоль/л до $14,32 \pm 0,3$ ммоль/л ($p < 0,001$), т.е. развилась стойкая гипергликемия. Концентрация гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) была также достоверно выше ($8,6 \pm 0,71\%$, $p < 0,001$) по сравнению с контрольными данными ($5,3 \pm 0,81\%$). На фоне стойкой гипергликемии в течение 2-4 недель развился окислительный стресс, сопровождающийся повышением концентрации МДА в мембранах эритроцитов в гомогенатах коркового и мозгового вещества почек, печени и миокарда. Одновременно происходило снижение активности СОД в эритроцитах, сыворотке крови, повышение активности каталазы и концентрации церулоплазмينا. У крыс с СД концентрация суммарных метаболитов NO в сыворотке крови была статистически достоверно ниже по сравнению с контрольными данными (таблица). Развилась эндотелиальная дисфункция, биохимическими маркерами которой явились повышение концентрации МДА в крови и снижение содержания суммарных метаболитов NO в сыворотке крови.

ВЛИЯНИЕ АФОБАЗОЛА НА ФУНКЦИЮ ЭНДОТЕЛИЯ У ДИАБЕТИЧЕСКИХ КРЫС

Таблица. Динамика концентрации МДА, активности ферментов АОС, метаболитов оксида азота и экспрессии eNOS при экспериментальном сахарном диабете на фоне терапии афобазолом.

Показатель	Контроль	ЭСД	ЭСД+афобазол
МДА (эритроциты), нмоль/мл	6,87±0,45	8,65±0,47 ^а	4,235±0,082 ^{с-****}
МДА (корковый слой почек), нмоль/мг белка	3,18±0,22	4,39±0,18 ^с	3,753±0,167 ^{а-***}
МДА (мозговой слой почек), нмоль/мг белка	4,28±0,13	6,62±0,17 ^с	4,686±0,233 ^{а-****}
МДА (печень), нмоль/мг белка	1,863±0,047	2,248±0,063 ^с	2,008±0,024 ^{а-***}
МДА (сердце), нмоль/мг белка	2,439±0,067	2,703±0,066 ^а	2,494±0,051 ^{а*}
Активность СОД (эритроциты), усл.ед.	88,2±1,655	64,4±2,159 ^с	83,222±5,101 ^{а-***}
Активность СОД в сыворотке крови, усл.ед	2,55±0,46	1,45±0,04 ^б	1,78±0,148 ^{а*}
Активность каталазы в сыворотке мкал/л	225,6±29,1	345,3±3,3 ^с	337,6±6,528 ^а
Концентрация церулоплазмينا (сыворотка крови), мг/л	338,667±10,428	376,6±7,291 ^а	341,5±1,98 ^{а-****}
Концентрация NOx, (сыворотка крови) мкМ	51,069±0,531	32,54±1,425 ^с	49,041±0,0878 ^{а-****}
Экспрессия eNOS, (аорта) усл.ед.	0	0	4,6±2,8

Примечание: Достоверность по сравнению с контролем: а - p<0,05; б - p<0,02; в - p<0,01; г - p<0,001. Достоверность по сравнению с экспериментальным СД без лечения: * - p<0,05; ** - p<0,02; *** - p<0,01; **** - p<0,001.

Продукты ПОЛ вызвали повреждение сосудистого эндотелия, в частности аорты, в которой гистологически выявлена очаговая эксфолиация эндотелия, расширение щелей между сохранившимися дистрофически изменёнными эндотелиоцитами, разрыхление, гомогенизация и очаговая фрагментация внутренней эластической мембраны аорты, плазматическое пропитывание интимы с отложением в ней эозино- и базофильных веществ с очагами мукоидного и фибриноидного набухания парапластической субстанции, гидропическая дистрофия отдельных эндотелиоцитов, базофилия ядер, смещённых к периферии цитоплазмы, слабо выраженная клеточная реакция стромы, а так же фокальные некрозы, сужение просвета, плазматическое пропитывание, отек стенок мелких сосудов, питающих аорту.

Для коррекции избыточного ПОЛ, нарушений системы антиоксидантной защиты (АОЗ), сниженной концентрации NO и гистопатоморфологических изменений животным с ЭСД в течение 30 дней вводили афобазол (рис. 1). Результаты, представленные в таблице, свидетельствуют о существенном снижении концентрации МДА в крови и в гомогенатах почечной, печёночной и миокардиальной ткани под влиянием афобазола. Анализ активности антиоксидантной системы показал достоверное возрастание активности СОД в сыворотке крови и эритроцитах, а повышенные данные активности каталазы и концентрации церулоплазмينا в сыворотке крови достоверно снизились, хотя активность каталазы по сравнению с контролем осталась повышенной, что, вероятно, можно рассматривать как проявление клеточной компенсаторной реакции. В группе крыс с ЭСД на фоне лечения афобазолом статистически достоверно повысилась концентрация оксида азота в сыворотке крови (таблица).

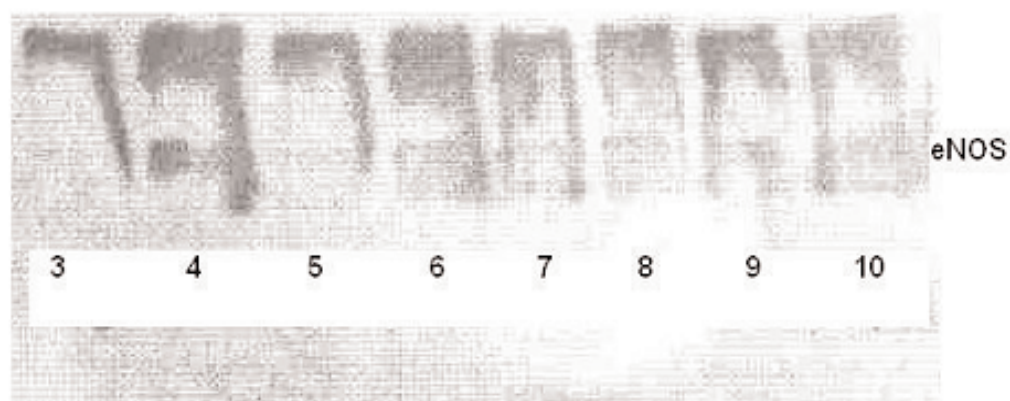


Рисунок 1.

Иммуноблот. Экспрессия эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) (140 кДа) в крысиных аортах на фоне экспериментального сахарного диабета (ЭСД) при терапии афобазолом. Интенсивность полосы после сканирования выражена в пикселях. Результаты нормализовали: представляли в условных единицах как отношение интенсивности полосы X к интенсивности контрольной полосы ЭСД. №3 - контроль; №№4-10 - ЭСД + афобазол.

Для выяснения механизма повышения концентрации NO мы исследовали уровень экспрессии фермента eNOS у диабетических крыс на фоне лечения афобазолом по сравнению с данными при нелеченном ЭСД. Данные, представленные в таблице и на рисунке 2, демонстрируют повышение экспрессии фермента и одновременное нарастание концентрации суммарных метаболитов NO на фоне лечения афобазолом. Полученные нами данные согласуются с результатами других исследователей [19, 20], показавших, что супероксид радикал (O_2^-) обладает способностью тормозить экспрессию и активность eNOS, а также связывать и инактивировать NO, превращая его в пероксинитрит. Данные других авторов [21] подтверждают повышенное образование O_2^- в дыхательной цепи и возможность оксидативного поражения эндотелия сосудов при ЭСД.

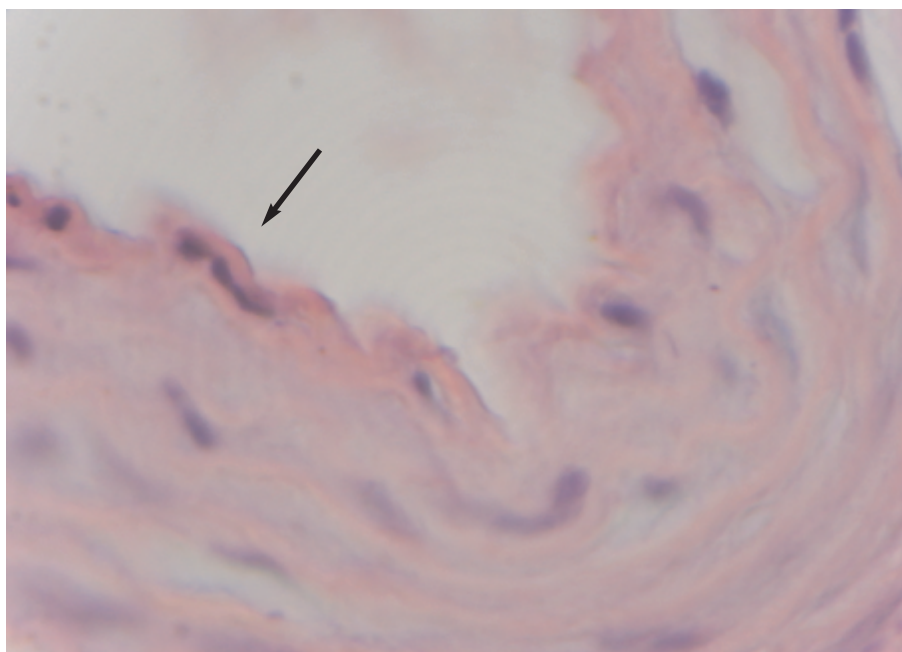


Рисунок 2.

Гистологическая картина эндотелия аорты при ЭСД. (Окраска гематоксилином и эозином, $\times 600$.)

ВЛИЯНИЕ АФОБАЗОЛА НА ФУНКЦИЮ ЭНДОТЕЛИЯ У ДИАБЕТИЧЕСКИХ КРЫС

Полученные результаты позволяют заключить, что изучаемый препарат афобазол, вводимый животным в течение месяца в дозе 10 мг/кг, положительно влиял на функциональную активность сосудистого эндотелия, что проявлялось усилением продукции оксида азота, эффект которого на гладкомышечные клетки (ГМК) сосудистой стенки реализуется через активацию растворимой гуанилатциклазы и повышение содержания сGMP, что, в свою очередь, приводит к снижению внутриклеточного содержания Ca^{2+} и вазодилатации [22, 23]. Эффекты афобазола на экспрессию eNOS и концентрацию NO, полученные в наших исследованиях при ЭСД, подтверждают предположение авторов [24, 25] о способности данного препарата индуцировать экспрессию eNOS и, тем самым, нормализовать концентрацию суммарных метаболитов NO, улучшая кровообращение в ишемизированных органах.

Нормализация NO-продуцирующей функции eNOS была сопряжена с восстановлением гистологической структуры эндотелия аорты. Действительно, на фоне введения афобазола отмечены гипертрофия и увеличение числа эндотелиальных клеток, уменьшение межэндотелиальных промежутков и плазматического пропитывания стенки аорты. Гистоструктурные признаки очаговой регенерации ГМК и эластических волокон адекватны пролиферации лимфогистиоцитарных образований. Накопление пылевидного материала в ядрах и цитоплазме эндотелиальных клеток, в основном в интима аорты и сосудов, питающих её, свидетельствует об активации ядерно-цитоплазматических регенераторных процессов (рис. 3). Выявление защитного действия афобазола на интенсивность ПОЛ, метаболизм NO и гистопатоморфологические проявления эндотелиальной дисфункции у крыс с ЭСД согласуется с исследованиями Крыжановского С.А. и соавторов [6], показавших способность данного препарата стимулировать пролиферативные процессы в миокарде, способствуя уменьшению площади ишемического повреждения.

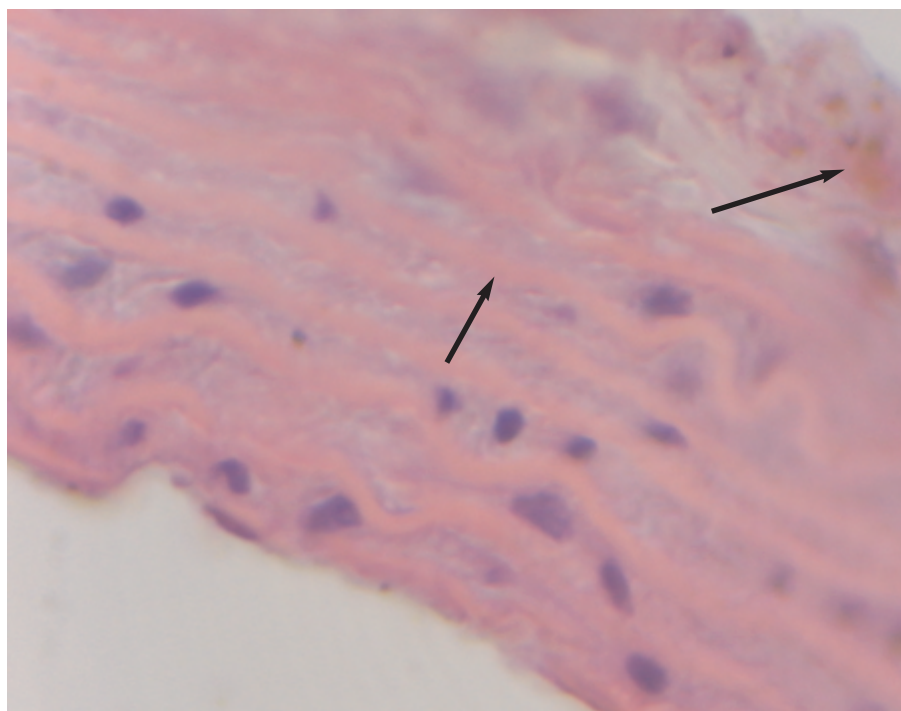


Рисунок 3.

Гистологическая картина эндотелия аорты у крыс с ЭСД на фоне лечения афобазолом.
(Окраска гематоксилином и эозином, $\times 600$.)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Таким образом, изменения концентрации NO, уровня экспрессии eNOS, а также показателей ПОЛ и АОС: концентрации МДА и активности ферментов СОД, каталазы и концентрации церулоплазмينا в эритроцитах и сыворотке крови являются показателями эндотелиальной дисфункции, лежащей в основе сосудистых осложнений на экспериментальной модели СД типа 1. Коррекция сосудистых осложнений СД и метаболизма NO на фоне лечения афобазолом приводит к снижению интенсивности свободнорадикального окисления в эритроцитах, повышению активности СОД и концентрации стабильных метаболитов оксида азота в крови и уровня экспрессии NO-продуцирующего фермента (eNOS) клеток сосудистого эндотелия аорты. Наряду с биохимическими показателями афобазол способствует восстановлению гистологической картины эндотелия сосудов на примере аорты у крыс с ЭСД.

ЛИТЕРАТУРА

1. Farkas K., Sharman B., Jermendy G. et al. (2000) Diabetes Nutr. Metab., **13**, 287-297.
2. Goldin A., Beckman J.A., Schmidt A.M., Creager M.A. (2006) Circulation, **114**, 597-605.
3. Creager M.A., Luscher T.F., Cosentino F., Beckman J.A. (2003) Circulation, **108**, 1527-1532.
4. Endemann D.H., Schiffrin E.L. (2004) Curr. Hypertens. Rep., **6**, 85-89.
5. Bitar M.S., Wahid S., Mustafa S. et al. (2005) Eur. J. Pharmacol., **511**, 53-64.
6. Крыжановский С.А., Сорокина А.В., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Мирошкина И.А., Цорин И.Б., Дурнев А.Д., Серединин С.Б. (2010) Бюлл. эксперим. биол. мед., **150**(9), 284-287.
7. Ajmo C.T. Jr., Vernon D.O., Collier L. et al. (2006) Curr. Neurovasc. Res., **3**(2), 89-98.
8. Дурнев А.Д., Соломина А.С., Жанатаев А.К., Жуков В.Н., Серединин С.Б. (2010) Бюлл. эксперим. биол. мед., **149**(3), 286-289.
9. Tchedre K.T., Huang R.Q., Dibas A. et al. (2008) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **49**(11), 4993-5002.
10. Halliwell B. (2006) J. Neurochem., **97**(6), 1634-1658.
11. Vagnerova K., Hurn P.D., Bhardwaj A., Kirsch J.R. (2006) Anesth. Analg., **103**(2), 430-434.
12. Calvert J.W., Lefer D.J. (2009) Cardiovasc. Res., **83**(2), 195-203.
13. Asakawa T., Matsushita S. (1980) Lipids, **15**(3), 137-140.
14. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. (1988) Лаб. дело, №1, 16-19.
15. Камышников В.С. (2003) Клинико-биохимическая лабораторная диагностика. **2**, 71-77.
16. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. (2005) Клини. лаб. диагн., №6, 15-18.
17. Метельская В.А., Гуманова Н.Г., Литинская О.А. (2004) Вопр. биол. мед. фарм. химии, №2, 34-39.
18. Автандилов Г.Г. (2002) Основы количественной патологической анатомии, М.: Медицина.
19. Beckman J.S. (2001) Circulat. Res., **89**, 295-297.
20. Ferdinandy P., Schulz R. (2003) Br. J. Pharmacol., **183**, 532-542.
21. Rosca M.G., Mustata T.G., Kinter M.T. et al. (2005) Am. J. Physiol. Renal. Physiol., **289**(2), 420-430.
22. Северин Е.С. (ред.) (2007) Биохимия. 4 издание (испр.), М.: ГЕОТАР-МЕД.
23. Murad F. (1999) Biosci. Rep., **19**, 133-154.
24. Незнамов Г.Г., Сюняков С.А., Чумаков Д.В. и др. (2005) Ж. неврол. психиатр. им. С.С. Корсакова, **105**(4), 35-40.
25. Серединин С.Б., Воронин М.В. (2009) Экспер. и клин. фармакол., **72**(1), 3-11.

Поступила: 15. 06. 2011.

THE INFLUENCE OF AFOBAZOLE ON BIOCHEMICAL AND
HISTO-PATHO-MORPHOLOGICAL PARAMETERS OF ENDOTHELIAL FUNCTION
AT EXPERIMENTAL DIABETES MELLITIS IN RATS

S.G. Dzugkoev¹, K.M. Kozyrev², N.G. Gumanova³, F.S. Dzugkoeva¹

¹ERAS institute of biomedical researches of Vladikavkaz centre of science of the Russian Academy of Science and Government RNO-Alania, ul. Pushkina, 40, Vladikavkaz, RNO-Alania, 362019 Russia; tel.: 89014972014; e-mail: fira-belikova@mail.ru

²SEE HPE North-Ossetian State medical academy of Roszdrav, Russia

³National research center for preventive medicine of the Ministry of Health of the Russian Federation

Oxidizing stress in rats with experimental diabetes mellitus is accompanied by endothelial dysfunction develops. Its biochemical markers are the increase of concentration of blood MDA, the impairments of cell antioxidant dependence and a decrease in concentration of total metabolites of NO and expression of endothelial NO-synthetase (e-NOS). Biochemical changes are considered with histopathomorphologic impairments of aortic endothelium. Treatment with afobazole suppressed free-radical oxidation, increased activity of SOD and concentration of total metabolites of NO and a level of eNOS expression and also restored of a histologic pattern of aortic endothelium due to activation of nucleocytoplasmic regenerative processes.

Key words: experimental diabetes mellitus (EDM), oxidative stress, nitric oxide, expression of endothelial NO-synthetase (eNOS), histology, afobazole.