Изучение влияния сулодексида на эндотелий-зависимую вазодилатацию мозговых сосудов у животных со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом

Тюренков И.Н., Воронков А.В., Слиецанс А.А., Петрова Е.В., Снигур Г.Л.

ГОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград
(ректор — д.м.н., засл. деятель науки РФ, засл. врач РФ, академик РАМН, проф. В.И. Петров)

Цель. Проанализировать влияние сулодексида на эндотелий-зависимую вазодилатацию (ЭЗВД) мозговых сосудов у животных с экспериментальным сахарным диабетом (ЭСД).

Материалы и методы. Исследование было выполнено на 45 крысах-самцах линии Wistar, массой 180–210 г, разделенных на 3 равные группы: группа интактных животных, группа с ЭСД, получавших физиологический раствор, группа животных с ЭСД, которым *per os* в течение 4 недель вводился сулодексид — 30 ЕВЛ. Эндотелиальная дисфункция (ЭД) моделировалась развитием ЭСД. ЭСД вызывали путем однократного *в/в* введения стрептозотоцина (50 мг/кг). Через месяц осуществлялось тестирование эндотелий-зависимой и эндотелий-независимой вазодилатации путем регистрации кровотока в сосудах мозга в проекции средней мозговой артерии, а также индексов Пурселло и Гослинга до и после внутривенного введения ацетилхолина (АХ) («Acros organics», США) (0,001 мг/кг), L-аргинина (300 мг/кг) («Acros organics», США), нитроглицерина (НГ) (МТХ, Москва) (0,007 мг/кг), нитро-L-аргинина (10 мг/кг) («Acros organics», США). Иммуногистохимическую подготовку образцов и исследование экспрессии антител к e-NOS и эндотелину-1 проводили по рекомендациям производителя используемых в данной работе антител (компания Novocastra™). Результаты всех опытов обрабатывались методами базисного статистического анализа в программе STATISTICA/7.0 фирмы StatSoft, Inc. (США) для Windows.

Результаты. У животных с ЭСД по сравнению с животными интактной группы при введении ацетилхолина отмечалось значительное снижение ЭЗВД (в 2,58 раза) и практически неизменная эндотелий-независимая вазодилатация (при введении нитроглицерина); наблюдалось достоверное повышение индексов сопротивления сосудов (индекс Пурселло) и эластичности сосудистой стенки (индекс Гослинга). У животных с ЭСД, получавших в течение 4 недель сулодексид, наблюдалось более низкое сопротивление и более высокая эластичность мозговых сосудов (индексы Пурселло и Гослинга), по сравнению с животными с ЭСД без фармакологической коррекции. Снижение экспрессии eNOS и увеличение экспрессии эндотелина-1 как специфических маркеров эндотелиальных нарушений дает возможность говорить о развитии эндотелиальной дисфункции при ЭСД, а также о выраженном эндотелиопротективном действии сулодексида, который значительно увеличивал концентрацию eNOS и снижал уровень эндотелина-1 и, очевидно, вследствие этого улучшал ЭЗВД.

Заключение. При введении сулодексида животным с ЭСД происходит снижение концентрации эндотелина-1 и увеличение концентрации eNOS, что приводит к улучшению вазодилатирующей функции эндотелия.

Ключевые слова: сулодексид, эндотелиальная дисфункция, сахарный диабет

The study of effects of sulodexide on endothelium-dependent vasodilation of brain vessels in animals with streptozotocin-induced diabetes mellitus

Tyurenkov I.N., Voronkov A.V., Slietsans A.A., Petrova E.V., Snigur G.L.
Volgograd State Medical University, Volgograd

Aim. To analyse effects of sulodexide on endothelium-dependent vasodilation (EDVD) of brain vessels in animals with experimental diabetes mellitus.

Materials and methods. The study was performed on 45 Wistar male rats (180–219 g b.w.) allocated to 3 equal groups. Group 1 served as control, group 2 included rats with DM given physiological saline, group 3 was comprised of animals with DM given sulodexide (30 LRU for 4 weeks). The endothelial dysfunction (ED) was simulated by inducing DM (single *v/v* injection of 50 mg/kg streptozotocin). A month later, the endothelium-dependent and independent vasodilation was tested by registration of circulation in brain vessels in the projection of the middle cerebral artery, determination of Pourcelot's and Gosling's indices before and after administration of 0.001 mg/kg acetylcholine (Acros organics, USA), 300 mg/kg L-arginine (Acros organics, USA), 0.007 mg/kg nitroglycerin (MTKh, Moscow), 10 mg/kg nitro-L-arginine (Acros organics, USA). Samples for immunohistochemical analysis were prepared using antibodies against e-NOS and endothelin-1 (Novocastra TM) as recommended by the manufacturer. STATISTICA/w7.0 program for Windows (StatSoft Inc., USA) was used for basic statistical analysis of the results of all experiments.

Results. Administration of acetylcholine to DM rats caused a much greater (2.58-fold) decrease of EDVD than in control animals whereas endothelium-independent vasodilation remained unaltered (following nitroglycerin administration); Pourcelot's and Gosling's indices significantly increased. DM rats given sulodexide showed lower Pourcelot's and Gosling's indices than untreated animals. Thus, impaired expression of antibodies against e-NOS and enhanced expression of anti-endothelin-1 antibodies (specific markers of endothelial disturbance) suggest development of ED in DM and endothelium protection by sulodexide that increases the eNOS level and decreases the endothelin-1 level thereby improving EDVD.

Conclusion. Administration of sulodexide to DM rats increases the eNOS level and decreases the endothelin-1 level thereby improving EDVD.

Key words: sulodexide, endothelial dysfunction, diabetes mellitus

Сулодексид, препарат из группы гликозаминогликанов, состоящий из смеси гепариноподобной фракции (80%) и дерматан-сульфата (20%), оказывает антитромботическое, профибринолитическое действие благодаря повышению отрицательного заряда сосудистой стенки и стимуляции

выброса из эндотелия простаглицлина. Препарат широко применяется для профилактики сердечно-сосудистых осложнений у больных сахарным диабетом (СД) [1]. Однако влияние сулодексида на вазодилатирующую функцию эндотелия описано мало. Известно, что при СД имеется значительная эндотелиаль-

Таблица 1

Изменение сосудистой вазодилатации у животных с экспериментальным сахарным диабетом на фоне введения сулодексида				
Название группы	Изменение кровотока на фоне введения анализаторов (%)			
	Ацетилхолин	L-аргинин	Нитроглицерин	N-L-аргинин
Контроль-интакт	36,6±3,8	6,7±1,64	50,6±2,44	-33,18±2,25
Контроль-сахарный диабет	14,16±2,21**	53,75±3,25***	49,66±1,86	-13,48±1,95**
Сулодексид+сахарный диабет	30,94±3,05↑	15,1±2,23↑	51,75±2,64	-26,66±1,64↑

Примечание: Контроль-интакт – интактная группа животных; контроль-сахарный диабет – группа животных с сахарным диабетом без лечения, сулодексид+сахарный диабет – группа животных с сахарным диабетом, получавших в качестве лечения сулодексид
 ** – достоверно по отношению к группе интактных животных (P≤0,01), ↑ – достоверно по отношению к группе животных с сахарным диабетом без лечения (P≤0,05) (достоверность оценивалась с помощью критерия Манна-Уитни)

Таблица 2

Изменение индексов периферического сопротивления (индекс Пурселло) и эластичности сосудистой стенки (индекс Гослинга) у животных с экспериментальным сахарным диабетом на фоне введения сулодексида				
Показатели	Группы животных	Контроль-интакт	Контроль-сахарный диабет	Сулодексид+сахарный диабет
Индекс Гослинга		0,33±0,05	0,53±0,03*	0,36±0,04#
Индекс Пурселло		0,37±0,02	0,72±0,02**	0,4±0,02#

Примечание: контроль-интакт – интактная группа животных, контроль-сахарный диабет – группа животных с сахарным диабетом без лечения, сулодексид+сахарный диабет – группа животных с сахарным диабетом, получавших в качестве лечения сулодексид
 ** – достоверно по отношению к группе интактных животных (P≤0,05), * – достоверно по отношению к группе интактных животных (P≤0,01), # – достоверно по отношению к группе животных с сахарным диабетом без лечения (P≤0,05). (достоверность оценивалась с помощью критерия Манна-Уитни)

ная дисфункция (ЭД), что является фактором риска развития острых и хронических нарушений мозгового кровообращения. Возможно, это связано с тем, что мозговые сосуды имеют самую мощную систему NO, и поэтому нарушение функции, в первую очередь вазодилатирующей, при СД имеет наиболее тяжелые последствия для церебральной гемодинамики.

Цель

Изучить влияние сулодексида на эндотелий-зависимую вазодилатацию (ЭЗВД) мозговых сосудов у животных с экспериментальным сахарным диабетом (ЭСД).

Материалы и методы

Исследование было выполнено на 45 крысах – самцах линии Wistar с массой 180–210 г, разделенных на 3 равные группы: группа интактных животных, группа с ЭСД, получавших физиологический раствор, группа животных с ЭСД, которым per os в течение 4 недель вводился сулодексид – 30 ЕВЛ (Vessel Due F фирмы Альфа Вассерман – Италия). ЭД моделировалась развитием ЭСД. ЭСД вызывали путем однократного внутривенного введения стрептозотоцина (50 мг/кг). В дальнейшем эксперимент отбирались животные с уровнем глюкозы в крови 12–15 ммоль/л. Через месяц после моделирования ЭСД и введения сулодексида осуществлялось тестирование эндотелий-зависимой и эндотелий-независимой вазодилатации путем регистрации кровотока в сосудах мозга в проекции средней мозговой артерии [2], а также индексов Пурселло и Гослинга, до и после внутривенного введения ацетилхолина (АХ) («Acros organics», США) (0,001 мг/кг), L-аргинина (300 мг/кг) («Acros organics», США), нитроглицерина (НГ) (МТХ, Москва) (0,007 мг/кг), нитро-L-аргинина (10 мг/кг) («Acros organics», США). Регистрация кровотока во всех экспериментах осуществлялась с помощью ультразвукового доплерографа, датчика УЗОП-010-01 с рабочей частотой 25 мгц и рабочей компьютерной программы ММ-Д-К-Minimax Doppler v.1.9. (Санкт-Петербург, Россия). В серии иммуногистохимических исследований была изучена экспрессия антител к e-NOS и эндотелину-1. Иммуногистохимическую подготовку и исследование образцов прово-

дили по рекомендациям производителя используемых в данной работе антител (компания Novocastra™). Для гистологического исследования через 4 недели от начала эксперимента под эфирным наркозом производили забор головного мозга крыс. Материал фиксировали в течение 48 ч 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. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятой гистологической методике.

Далее с использованием моноклональных антител к эндотелину-1 (Endothelin-1 Receptor (ETA), Clone RJT 24, NCL-L-ETA P (HIER)) и моноклональных антител к эндотелиальной NOS (Nitric Oxid Synthase, Clone RN5, NCL-NOS-3 F P (HIER)) и непрямого иммунопероксидазного метода с высокотемпературной и ферментной демаскировкой антигенов определяли экспрессию и оптическую плотность полученных образцов. Микрофото съемку производили цифровой камерой Canon (Japan, 5.0 мегапикселей) на базе микроскопа Axiostar plus (Карл Цейс, Германия) с использованием объектива ×40, ×100 и окуляра ×10. Оценивали процентное отношение иммунопозитивных клеток к общему количеству эндотелиальных клеток мозга.

Результаты всех опытов обрабатывались методами базисного статистического анализа в программе STATISTICA/w7.0 фирмы StatSoft, Inc. (США) для Windows.

Результаты и их обсуждение

Результаты, отражающие реакции мозговых сосудов (по изменению скорости мозгового кровотока), эластичность (индекс Гослинга) и сопротивление церебральных сосудов (индекс Пурселло) в ответ на введение анализаторов (ацетилхолина, нитро-L-аргинина, L-аргинина) у животных контрольной группы без ЭСД, у животных с ЭСД, получавших физиологический раствор, животных с ЭСД, получавших в течение месяца после введения стрептозотоцина сулодексид, представлены в таблицах 1 и 2. У животных с ЭСД по сравнению с животными интактной группы при введении ацетилхолина отмечалось значительное снижение ЭЗВД (в 2,58 раза) и практически неизменная эндо-

Таблица 3

Результаты исследований, полученные при оценке полуколичественной шкалы иммуногистохимической реакции		
	Эндотелиин-Clone RJT	Эндотелиальная-NOS Clone RN5
	Полуколичественная шкала оценки иммуногистохимической реакции	
Контроль-интакт	+	+++
Контроль-сахарный диабет	+++	+
Сулодексид+сахарный диабет	++	+++

Примечание: полуколичественная шкала оценки иммуногистохимической реакции: 0 – негативное окрашивание;

+ – слабое окрашивание; ++ – умеренное окрашивание;

+++ – выраженное окрашивание. Контроль-интакт – интактная группа животных, контроль-сахарный диабет – группа животных с сахарным диабетом без лечения, сулодексид+сахарный диабет – группа животных с сахарным диабетом, получавших в качестве лечения сулодексид телий-независимая вазодилатация (при введении нитроглицерина), что согласуется с литературными данными [3].

У животных на фоне ЭСД наблюдали также достоверное повышение индексов сопротивления сосудов (индекс Пурселло) и эластичности сосудистой стенки (индекс Гослинга), что согласуется с литературными данными [4]. Очевидно, у животных с ЭСД меньше выделяется оксида азота, наблюдается меньшее увеличение кровотока (меньшее расширение сосудов), а в ответ на введение блокатора e-NOS – меньшее падение кровотока, чем у животных интактной группы. Степень сужения мозговых сосудов и падение кровотока в них в последнем случае зависят от уровня исходной активности e-NO-синтазной системы, т.е. чем она активнее синтезирует NO, тем больше при блокаде NO-синтезирующего фермента будет сужение сосудов и падение кровотока. Другим показателем, свидетельствующим о наличии ЭД, являлся L-аргининовый парадокс [5]. Суть L-аргининового парадокса можно сформулировать следующим образом: при нарушении функции эндотелия отмечается повышение уровня асимметричного диметиларгинина (ADMA), конкурентно нарушающего транспорт L-аргинина в эндотелиоцит и угнетающего e-NOS [5]. Дополнительное введение эндогенного L-аргинина на фоне эндотелиальной дисфункции приводило к преодолению этих барьеров и усилению синтеза, выброса NO и к более выраженной вазодилатации, тогда как в норме, т.е. в отсутствие больших количеств ADMA в крови, дополнительное введение L-аргинина не вызывало значимого увеличения синтеза NO, т.к. эндотелиоцит получает достаточное количество субстрата для продукции оксида азота.

В нашем исследовании, при дополнительном введении L-аргинина, мы наблюдали его вазодилатирующее действие у животных с ЭСД, тогда как у интактных животных, а также у животных с ЭСД, получавших сулодексид, введение L-аргинина вызывает менее выраженную вазодилатацию. Таким образом, у животных с ЭСД, получавших сулодексид, ЭЗВД была значительно выше, чем у животных с ЭСД, получавших физиологический раствор (табл. 1).

У животных с ЭСД, получавших в течение 4 недель сулодексид, наблюдались более низкое сопротивление и более высокая эластичность мозговых сосудов (индексы Пурселло и Гослинга), по сравнению с животными с ЭСД без фармакологической коррекции. Несмотря на то, что регистрация сопротивления и жесткости сосудов осуществляется на небольшой сосудистой области, получены отчетливые данные о повышении жесткости сосудов при ЭСД и выраженном действии на этот фактор риска исследуемого препарата. Эти данные могут служить еще одним подтверждением положительного влияния сулодексида на вазодилатирующую функцию эндотелия (табл. 2).

Таким образом, снижение вазодилатирующей функции эндотелия у животных с ЭСД скорее обусловлено нарушением

Таблица 4

Морфометрическая оценка эндотелина-1 и эндотелиальной-NOS по оптической плотности у животных с экспериментальным сахарным диабетом и животных с экспериментальным сахарным диабетом, получавших сулодексид		
	Эндотелиин-Clone RJT	Эндотелиальная-NOS Clone RN5
	Оптическая плотность (единицы яркости)*	
Контроль-интакт	45,9±3,5	76,3±3,2
Контроль-сахарный диабет	64,2±3,6♦	43,4±2,7♦♦
Сулодексид+сахарный диабет	50,2±2,6	67,4±2,4

Примечание: контроль-интакт – интактная группа животных, контроль-сахарный диабет – группа животных с сахарным диабетом без лечения, сулодексид+сахарный диабет – группа животных с сахарным диабетом, получавших в качестве лечения сулодексид; * – 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 (критерий Уайта-Вилкоксона).

функционирования e-NO-синтазной системы, о чем свидетельствует меньшая вазодилатация (меньшее увеличение скорости кровотока) при введении ацетилхолина и меньшая вазоконстрикция при введении блокатора e-NO-синтазы N-L-аргинина.

При проведении иммуногистохимического исследования было отмечено, что в группе животных с ЭСД отмечалось слабое окрашивание к моноклональному антигену Clone RN5 (e-NOS) иммунопозитивных клеток гематоэнцефалического барьера во всех отделах головного мозга и более выраженное окрашивание к моноклональному антигену Clone RJT (эндотелин-1). В группе животных, получавших сулодексид на фоне ЭСД, степень экспрессии антигенов отличалась от группы животных без фармакотерапии и приближалась по степени окрашивания к животным интактной группы (табл. 3).

При оценке оптической плотности уровень экспрессии Clone RN5 (eNOS) в группах животных с ЭСД был на 56,8% ниже, чем у интактных животных. У животных же, получавших сулодексид, данный показатель достоверно не отличался от группы интактных животных (табл. 4).

При оценке оптической плотности уровень экспрессии Clone RJT (эндотелин-1) в группе животных с ЭСД был на 39,9% выше, чем у интактных животных. При изучении морфологического материала мозга животных с ЭСД, получавших сулодексид, уровень оптической плотности Clone RJT недостоверно отличался от группы интактных животных.

Таким образом, снижение экспрессии eNOS и увеличение экспрессии эндотелина-1 как специфических маркеров эндотелиальных нарушений дает возможность говорить о развитии ЭД при ЭСД, а также о выраженном эндотелиопротективном действии сулодексида, который значительно увеличивал концентрацию eNOS, снижал уровень эндотелина-1 и, очевидно, вследствие этого улучшал ЭЗВД.

Выводы

1. При ЭСД наблюдалась выраженная ЭД, сопровождающаяся уменьшением количества eNOS и увеличением эндотелина-1, что, в свою очередь, приводило к снижению вазодилатирующей функции эндотелия, а также повышению сопротивления и жесткости сосудов.
2. Сулодексид увеличивал количество eNOS и снижал содержание эндотелина-1 в сосудах мозга животных с ЭСД, что улучшало вазодилатирующую функцию эндотелия у крыс с гормональной патологией на фоне введения сулодексида.

Литература

1. Lanver D.A., Lucchesi B.R. Sulodexide: a renewed interest in this glucosaminoglycan // *Cardio. Drug.* – 2006. – №24 (3–4). – P. 214–226
2. Тюренков И.Н., Воронков А.В. Методический подход к оценке эндотелиальной дисфункции в эксперименте // *Эксперим. и клинич. фармакология.* – 2008. – Т. 71. – №1. – С. 49–51
3. Bakker W., Etto C., Eringa, P., Sipkema. Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity // *Cell Tissue Res.* – 2009. – №335. – P. 165–189
4. Cruickshank K., Riste L., Anderson S.G., Wright J.S., Dunn G., Gosling R.G. Aortic pulse-wave velocity and its relationship to mortality in diabetes and glucose intolerance: an integrated index of vascular function? // *Circulation.* – 2002. – Vol. 106. – № 16. – P. 2085–2090.
5. Воронков А.В., Робертус А.И., Тюренков И.Н. Изучение «L-аргининового парадокса» для оценки эндотелиальной функции в норме и патологии // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* – 2008. – Т.7. – №3. – С. 54–58
6. Bode-Boger SM. The l-arginine paradox: Importance of the l-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. // *Pharmacol Ther.* – 2007. – Vol. 114(3). – P. 295–306.

Тюренков Иван Николаевич

д.м.н., проф., зав. кафедрой фармакологии и биофармации ФУВ, ГОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград

E-mail: fibfuv@mail.ru

Воронков Андрей Владиславович

к.м.н., н.с. лаборатории кровообращения, ГОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград

Слиецанс Анна Альбертовна

к.ф.н., ассистент кафедры фармакологии и биофармации ФУВ, ГОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград

Петрова Евгения Викторовна

аспирант кафедры фармакологии и биофармации ФУВ, ГОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград

Снигур Григорий Леонидович

к.м.н., ассистент кафедры патологической анатомии, ГОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград