

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

УДК 616-092.9

В.Г. Банзаракшеев

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ МОДЕЛИРОВАНИЯ АТЕРОГЕННОЙ ДИСЛИПИДЕМИИ У КРЫС

ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет», Улан-Удэ, Россия

В статье представлена патофизиологическая оценка результатов моделирования атерогенной дислипидемии у крыс. Установлено, что индукция дислипидемии сопровождается выраженными изменениями показателей липидного обмена, в том числе увеличением количества модифицированных липопротеинов низкой плотности. Кроме того, на фоне липидного дисметаболизма наблюдаются признаки дисфункционального состояния эндотелия, характеризующиеся возрастанием уровня десквамированных эндотелиоцитов, гиперцитокинемией и повышенным содержанием белков острой фазы воспаления.

Ключевые слова: атерогенная дислипидемия, липидный обмен, эндотелиальная дисфункция

PATHOPHYSIOLOGICAL RATIONALE FOR THE RESULTS OF ATHEROGENIC DYSLIPIDEMIA SIMULATION IN RATS

V.G. Banzaraksheev

Buryat State University, Ulan-Ude, Russia

The article presents the pathophysiological assessment of the results of atherogenic dyslipidemia simulation in Wistar rats. Dyslipidemia was followed by 24 % increase of triglyceride and 19 % raise of total cholesterol in blood, while the atherogenic cholesterol of low density lipoproteins increased by 39 %, and the content of anti-atherogenic cholesterol of high density lipoproteins decreased by 21 %. Furthermore, the level of modified low density lipoproteins in the blood increased by 1.8 times. On the background of lipid storage disorder the rats of the experimental group showed the signs of endothelial dysfunction: circulating endothelial cell number increased by 1.9 times, proinflammatory cytokines interleukin-1beta (IL-1β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) increased by 21, 18 and 16 % respectively, high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) concentration – by 2.2 times, and fibrinogen concentration – by 17 %.

Key words: atherogenic dyslipidemia, lipid metabolism, endothelial dysfunction

ВВЕДЕНИЕ

По данным ВОЗ, в мире от сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний, обусловленных атеросклерозом, ежегодно умирают 15 млн человек, а по прогнозам экспертов к 2020 г. эта цифра может вырасти до 25 млн [4].

Сложившаяся неблагоприятная ситуация обусловлена ростом распространенности факторов риска атеросклероза, среди которых, несомненно, лидирующие позиции занимает дислипидемия [1, 2]. Как известно, проатерогенное влияние дислипидемии, наряду с гипеоантиоксидантностью, служит дополнительным фактором риска, позволяющим отнести атеросклероз к так называемым «свободнорадикальным патологиям» [6]. В этом случае окислительная модификация липопротеинов низкой плотности оказывает локальную проатерогенную стимуляцию на эндотелий, в результате чего кардинально изменяются гомеостатические свойства эндотелия, одним из которых является активация его провос-

палительного потенциала. Последний в синергизме с другими вазотоксическими компонентами усугубляет деэндотелизацию и вносит дополнительный вклад в процесс повреждения эндотелия и эволюцию атеросклероза [7, 12].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Патофизиологическое обоснование результатов моделирования атерогенной дислипидемии у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на крысах линии Wistar обоего пола с исходной массой тела 180–190 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при одинаковом уходе и питании, световом и температурном режиме, в соответствии с Приказом МЗ РФ № 708Н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Экспериментальные исследования проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.) и «Правилами,

принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных» (Страсбург, 1986).

Дислипидемию индуцировали у крыс назначением атерогенной диеты в течение 12 недель путем ежедневного внутрижелудочного введения холестерина в дозе 0,1 г/100 г массы, 1 мл/100 г массы молока 3,5%-й жирности и 30 000 ЕД/100 г витамина D₂ [9].

Для оценки состояния липидного обмена в сыворотке крови животных исследовали следующие показатели: общий холестерин (ОХС), триглицериды (ТГ), холестерин липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), холестерин липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП) ферментативным методом на биохимическом анализаторе «Mindray BS-380» [5].

Уровень модифицированных ЛПНП (мЛПНП) определяли фотометрическим экспресс-методом с раствором поливинилпирролидона и регистрацией степени помутнения смеси [10].

Для оценки дисфункционального состояния эндотелия в крови крыс измеряли содержание провоспалительных цитокинов: интерлейкин-1бета (ИЛ-1β), интерлейкин-6 (ИЛ-6) и фактор некроза опухоли-альфа (ФНО-α), – методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем «Вектор Бест» на анализаторе «HumaReader HS» [3].

Содержание в крови количества циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) определяли по методу Hladovec [11].

Динамику белков острой фазы воспаления изучали по концентрации высокочувствительного С-реактивного белка (вчСРБ) методом иммуноферментного анализа с помощью тест-системы «Вектор Бест» на анализаторе «HumaReader HS» и фибриногена количественным методом по Рутбергу [5].

Полученные данные статистически обработаны с применением пакета прикладных программ MS Excel. Значимость различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенных нами исследований установлено, что 12-недельное назначение крысам атерогенной диеты сопровождалось существенным расстройством у них липидного обмена (табл. 1).

Таблица 1
Показатели липидного обмена при индуцированной дислипидемии у крыс ($M \pm m$)

Показатели	Группы животных	
	Интактная ($n = 10$)	Опытная ($n = 10$)
ОХС, ммоль/л	1,75 ± 0,14	2,08 ± 0,10
ХС ЛПВП, ммоль/л	0,75 ± 0,11	0,59 ± 0,12
ХС ЛПНП, ммоль/л	0,56 ± 0,01*	0,78 ± 0,02*
ТГ, ммоль/л	0,53 ± 0,04*	0,66 ± 0,10
мЛПНП, ЕД	52,4 ± 2,3	95,3 ± 3,15

Примечание. * – различия по сравнению с контролем статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Как видно из данных, приведенных в таблице 1, алиментарная жировая нагрузка у крыс характери-

зовалась выраженными лабораторными признаками дислипидемии. Так, в липидограмме опытной группы животных содержание ТГ увеличивалось на 24 %, уровень ОХС возрастал на 19 %, причем содержание атерогенного ХС ЛПНП повышалось на 39 %, а содержание антиатерогенного ХС ЛПВП снижалось до 21 %. По всей видимости, такая динамика липидного дисбаланса является закономерным результатом патофизиологических нарушений процессов абсорбции и транспорта экзогенных липидов. Как известно, избыточное и несбалансированное питание, а также высокая калорийность животных жиров определяет не только развитие, выраженность и длительность постпрандиальной дислипидемии, но и нарушение механизмов утилизации этих компонентов пищи и запуск порочного круга дисметаболизма липидов [2].

Сегодня не вызывает сомнений тот факт, что атерогенная дислипидемия является одним из наиболее частых эндогенных источников прооксидантов, реализующим свое повреждающее действие посредством снижения эффективности функционирования антиоксидантных систем утилизации свободных радикалов [6]. При дальнейшем анализе результатов эксперимента, представленных в таблице 1, видно, что индукция хронической дислипидемии, помимо выраженных нарушений липидного обмена, приводила к возрастанию в крови в 1,8 раза уровня мЛПНП, в сравнении с таковым в интактной группе крыс. Такая динамика согласуется с данными о том, что длительная гиперлипидемия способствует окислительной модификации и формированию перекисно-модифицированных ЛПНП. При этом перекисление повышает атерогенность ЛПНП посредством усиленного их захвата макрофагами и прямой цитотоксичности по отношению к клеткам эндотелия [6, 13]. В данном случае патофизиологическая роль модифицированных форм липопротеинов заключена в их повреждающем проатерогенном воздействии на эндотелиоциты, которые не только являются своеобразными биомаркерами активации деструктивных процессов, но и характеризуют степень выраженности дисфункции эндотелия (табл. 2).

Таблица 2
Содержание количества ЦЭК в крови крыс при индуцированной дислипидемии ($M \pm m$)

Группы животных	Количество ЦЭК, ЕД/100 мкл
Интактная ($n = 10$)	5,8 ± 1,09
Опытная ($n = 10$)	11,1 ± 4,17

Из результатов эксперимента, приведенных в таблице 2, видно, что в группе крыс, находившихся на атерогенной диете, развившиеся нарушения липидного обмена значимо ассоциировались с повышением в крови количества ЦЭК – основных маркеров повреждения эндотелия. Так, у животных данной группы степень деэндотелизации сосудов возрастала в 1,9 раза, по сравнению с данными в интактной группе крыс. Высокое содержание десквамированных эндотелиоцитов позволяет судить о том, что длительная дислипидемия является прямой причиной

выраженной активности деструктивных процессов в сосудистой стенке. В ответ на такой проатерогенный стимул включаются механизмы естественной регенерации, поэтому компенсаторное возрастание числа ЦЭК может свидетельствовать не только о высокой активности и необратимости процесса десквамации, но и о несостоятельности механизмов реэндотелизации сосудов в условиях дислипидемии [7].

Одним из механизмов повреждающего действия атерогенной дислипидемии, вызывающей состояние дисфункции эндотелия, выступает его провоспалительная активация [7, 12]. Последующий ход экспериментальных исследований показал, что в опытной группе крыс индуцированные нарушения липидного обмена ассоциировались с повышением уровня провоспалительных цитокинов (табл. 3).

Таблица 3
Содержание провоспалительных цитокинов и острофазовых белков воспаления в крови крыс при дислипидемии ($M \pm m$)

Показатели	Интактная ($n = 10$)	Опытная ($n = 10$)
ИЛ-1 β , пг/мл	$2,07 \pm 0,15$	$2,50 \pm 0,23$
ИЛ-6, пг/мл	$4,78 \pm 0,38$	$5,64 \pm 0,43$
ФНО- α , пг/мл	$2,02 \pm 0,19$	$2,34 \pm 0,14$
вЧСРБ, мг/л	$5,71 \pm 0,27$	$12,58 \pm 0,11$
Фибриноген, г/л	$0,76 \pm 0,09^*$	$0,89 \pm 0,03^*$

Анализ цифровых данных таблицы 3 показал, что концентрация провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α возросла на 21, 18 и 16 % соответственно по отношению к аналогичным данным у животных интактной группы. Общеизвестно, что патофизиологическое значение экспрессии провоспалительных цитокинов заключено в образовании эндотелиальными клетками молекул адгезии, привлекающих моноциты к эндотелию и облегчающих их проникновение в сосудистую стенку [3]. Кроме того, выработка провоспалительных цитокинов, в частности ИЛ-6, стимулирует синтез и секрецию острофазовых белков – биомаркеров эндогенного воспаления, таких как фибриноген, гаптоглобин, вЧСРБ и др. [3, 5]. Из таблицы 3 видно, что в опытной группе животных гиперцитокинемия сопровождалась увеличением содержания белков острой фазы воспаления: вЧСРБ – в 2,2 раза, фибриногена – на 17 %, что позволяет судить о возрастании активности эндогенного воспаления, присущего патогенетическим механизмам атерогенеза [13].

Таким образом, на основании патофизиологического анализа результатов экспериментальных исследований установлено, что дислипидемия у крыс, вызванная назначением атерогенной диеты, является адекватной моделью оценки порочного круга расстройств в условиях липидного дисметаболизма. Индуцированная дислипидемия сопровождалась расстройством гомеостаза организма животных в виде выраженного дисбаланса липидного обмена, а также окислительной модификации ЛПНП и развития дисфункционального состояния эндотелия – ини-

циального звена атерогенеза. Полученные данные позволяют провести патофизиологическую оценку атерогенной модели дислипидемии, что в будущем может быть использовано исследователями в целях как изучения механизмов развития, так и выбора методов рациональной терапии атеросклероза.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Банзаракшеев В.Г. Дислипидопропротеинемия как ведущий фактор риска развития и прогнозирования ишемической болезни сердца // Казанская наука. – 2010. – № 3. – С. 233–235.
2. Banzaraksheev VG (2010). Dyslipoproteinemia as a major risk factor for development and prediction of ischemic heart disease [Dislipoproteinemiya kak vedushchiy faktor riska razvitiya i prognozirovaniya ishemicheskoy bolezni serdtsa]. *Kazanskaya nauka*, (3), 233–235.
3. Бубнова М.Г., Оганов Р.Г. Нарушенная толерантность к пищевым жирам и ее значение в атеротромбогенезе // Терапевтический архив. – 2004. – № 1. – С. 73–78.
4. Bubnova MG, Oganov RG (2004). Impaired edible fats tolerance and its contribution to atherothrombogenesis [Narusheennaya tolerantnost' k pishchevym zhiram i ee znachenie v aterotrombogeneze]. *Terapevticheskiy arkhiv*, (1), 73–78.
5. Демьянов А.В., Котов А.Ю. Диагностическая ценность исследования уровней цитокинов в клинической практике // Цитокины и воспаление. – 2003. – № 2. – С. 20–35.
6. Dem'yanov AV, Kotov AYU (2003). Diagnostic value of investigation of cytokine levels in clinical practice [Diagnosticheskaya tsennost' issledovaniya urovney tsitokinov v klinicheskoy praktike]. *Tsitokiny i vospalenie*, (2), 20–35.
7. Журавлева М.В. Первичная и вторичная профилактика атеросклероза // Врач. – 2011. – № 5. – С. 45–49.
8. Zhuravleva MV (2011). Primary and secondary prevention of atherosclerosis [Pervichnaya i vtorichnaya profilaktika ateroskleroza]. *Vrach*, (5), 45–49.
9. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. – Минск: Беларусь, 2000. – 463 с.
10. Kamyshnikov VS (2000). Guide on clinico-biochemical diagnostics [Spravochnik po kliniko-biokhimicheskoy laboratornoy diagnostike], 463.
11. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. – Новосибирск: Арта, 2008. – 284 с.
12. Men'shchikova EB, Zenkov NK, Bondar' IA, Trufakin VA (2008). Oxidative stress: pathological conditions and diseases [Okislitel'nyy stress: Patologicheskie sostoyaniya i zabolevaniya], 284.
13. Петухов В.А. Эндотелиальная дисфункция: современное состояние вопроса // Consilium Medicum. – 2008. – № 1. – С. 3–11.
14. Petukhov VA (2008). Endothelial dysfunction: current state of the problem [Endotelial'naya disfunktsiya: sovremennoe sostoyanie voprosa]. *Consilium Medicum*, (1), 3–11.

8. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. – М.: ГЭОТАР-Медицина, 2001. – 256 с.

Sergienko VI, Bondareva IB (2001). Mathematical statistics in clinical studies [Matematicheskaya statistika v klinicheskikh issledovaniyakh], 256.

9. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.

Khabriev RU (2005). Manual on the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv], 832.

10. Шойбонов Б.Б., Баронец В.Ю., Панченко Л.Ф., Пальцын А.А. Простой способ определения модифицированных липопротеинов низкой плотности

// Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2012. – № 2. – С. 77–82.

Shoybonov BB, Baronets VYu, Panchenko LF, Pal'tsyn AA (2012). A simple method for determination of modified low-density lipoproteins [Prostoy sposob opredeleniya modifitsirovannykh lipoproteinov nizkoy plotnosti]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*, (2), 77-82.

11. Hladovec J (1978). The method of study of endothelial dysfunction. *Physiol. Bohemoslv*, 27, 140-144.

12. Packard RR, Libby P (2008). Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin. Chem.*, 54, 24-38.

13. Virella G, Lopes-Virella MF (2008). Atherosclerosis and humoral immune response to modified lipoproteins. *Atherosclerosis*, 20, 239-246.

Сведения об авторах

Information about the authors

Банзаракшеев Виталий Гамбалович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры общей патологии человека Медицинского института Бурятского государственного университета (670002, г. Улан-Удэ, ул. Октябрьская, 36а; тел.: 8 (3012) 28-39-26; e-mail: gambalovi4@mail.ru)

Banzaraksheev Vitaliy Gambalovich – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Human General Pathology of Medical Institute of Buryat State University (670002, Ulan-Ude, Oktyabrskaya str., 36a; tel.: +7 (3012) 28-39-26; e-mail: gambalovi4@mail.ru)