УДК [547.412.4 + 616.16-002/.-092.9]:615.917

СОСТОЯНИЕ ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ У КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ДИХЛОРЭТАНОМ

Срубилин Д.В.[1], Еникеев Д.А.[1], Мышкин В.А.[2]

[1]ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, Уфа, e-mail: rectorat@bashgmu.ru;
[2]Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека Роспотребнадзора России, Уфа, e-mail: bakirov@anrb.ru

Состояние эндотелия сосудов при хронической интоксикации дихлорэтаном (ДХЭ) практически не исследовано. Активация свободно-радикального окисления, накопление провоспалительных цитокинов, липополисахарида, оказывает повреждающее действие на эндотелий. В ранее выполненных исследованиях при хронической интоксикации ДХЭ выявлен дисбаланс в цитокиновой системе с преобладанием провоспалительного потенциала, который коррелируют с показателями, отражающими активность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), поэтому цель работы состояла в изучении уровня оксида азота (NO), эндотелина-1 и циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) в крови у крыс при хронической интоксикации ДХЭ. Эксперименты проведены на крысах-самцах, у которых моделировали хроническую интоксикацию путем внутрижелудочного введения ДХЭ в дозе 0,01 LD_{50} в течение 60 суток. Обнаружено увеличение содержания эндотелина-1, уменьшение образования оксида азота, возрастание количества ЦЭК. Проведенный корреляционный анализ выявил тесную связь между количеством ЦЭК и содержанием эндотелина-1 (r= +0,69; P=0,065), стабильных конечных метаболитов NO (r= –0,43; P=0,28) на 60 сутки хронической интоксикации ДХЭ. Выраженность эндотелиальных нарушений зависела от длительности введения ДХЭ. Полученные факты свидетельствуют о том, что в условиях хронической интоксикации ДХЭ имеются признаки нарушения функции эндотелия и его повреждения.

Ключевые слова: дихлорэтан, эндотелий, оксид азота, эндотелин-1, крысы, корреляция.

CONDITION OF VASCULAR ENDOTHELIUM OF RATS BY CHRONIC INTOXICATION BY DICHLOROETHANE

Srubilin D.V.[1], Enikeyev D.A.[1], Myshkin V.A.[2]

[1]Bashkirian State Medical University, Ufa, e-mail: rectorat@bashgmu.ru;
[2]Ufa Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, e-mail: bakirov@anrb.ru

The condition of vascular endothelium by chronic intoxication by dichloroethane (DCE) is practically not studied. The activation of free-radical oxidation, accumulation of proinflammatory cytokines, lipopolysaccharide, takes a damaging effect on endothelium. In previous studies, by chronic intoxication by DCE, the disbalance of cytokine system was identified, with predominance of proinflammatory potential, which correlates to indices showing the activity of lipid peroxidation processes, for this reason, the work objective was to study the level of nitrogen oxide (NO), endothelin-1 and circulating endothelial cells in the blood of rats by chronic intoxication by DCE. The experiments were conducted with male rats, chronic intoxication of which was modeled by intragastric administration of DCE in doses of 0,01 LD_{50} during 60 days. The increase of endothelin-1 content, decrease of nitrogen oxide formation, increase of circulating endothelial cells were detected. The correlation analysis showed a close connection between the number of circulating endothelial cells and the endothelin-1 content (r = +0,69; P = 0,065), stable terminal metabolites of NO (r = –0,43; P = 0,28) on the 60th day of chronic intoxication by DCE. The intensity of endothelial damage depended on the duration of DCE administration. The found facts witness that under the conditions of chronic intoxication by DCE, there are signs of endothelium dysfunction and damage.

Keywords: dichloroethane, endothelium, nitrogen oxide, endothelin-1, rats, correlation.

Хлорированные углеводороды, в частности дихлорэтан (ДХЭ), являются одними из наиболее токсичных веществ, широко используемых в быту, в промышленности и сельском хозяйстве. При сохраняющейся высокой летальности от острых интоксикаций ДХЭ наиболее часто встречаются состояния, связанные с длительным поступлением токсиканта в организм, при

этом способ введения ДХЭ, как показали многочисленные наблюдения, не оказывает существенного влияния на распределение его метаболитов [5]. Согласно данным литературы, биотрансформация ДХЭ происходит в несколько этапов. Начальный этап детоксикации яда происходит при участии цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ, вследствие чего липофильный ДХЭ превращается в гидрофильные метаболиты [3]. В результате биологического окисления ДХЭ образуется стабильный электрофильный радикал $ClCH_2$-CH_2, который способен алкилировать биосубстраты и активировать процессы пероксидации. Одним из основных путей дальнейшей детоксикации является реакция конъюгации метаболитов ДХЭ с восстановленным глутатионом [21].

Важным патогенетическим звеном токсического действия дихлорэтана на организм при его длительном поступлении являются активация процессов свободно-радикального окисления и изменения мембранных структур, что ведет к нарушению липид-липидных и липид-белковых взаимодействий. В ранее выполненных нами исследованиях установлена активация окислительного стресса в слизистой тонкого кишечника при хронической интоксикации ДХЭ, которая способствует транслокации эндотоксина из кишечника в системный кровоток [12], а также выявлен дисбаланс в цитокиновой системе с преобладанием провоспалительного потенциала, который коррелируют с показателями, отражающими активность процессов ПОЛ [13].

Общеизвестно, что активация свободно-радикального окисления, накопление веществ низкой и средней молекулярной массы (ВНСММ), провоспалительных цитокинов, липополисахарида оказывает повреждающее действие на эндотелий, вызывая его дисфункцию. Под дисфункцией эндотелия понимают дисбаланс между медиаторами, обеспечивающими в норме оптимальное течение всех эндотелий-зависимых процессов. Эндотелий синтезирует большое количество биологически активных веществ, важных для регуляции сосудистого тонуса, проницаемости, гемостаза, ангиогенеза и др. [4, 6, 8, 10, 11, 19]. Высокоспецифичными маркерами эндотелиальной дисфункции служат оксид азота (NO), эндотелин-1 (Et-1), а увеличение количества циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) относят к маркерам повреждения [11, 14, 18]. Выявлена важная роль дисфункции эндотелия в возникновении различной соматической патологии, однако состояние эндотелия сосудов при хронической интоксикации ДХЭ практически не исследовано.

В этой связи целью настоящего исследования явилось изучение уровня оксида азота, эндотелина-1 и ЦЭК в крови у крыс при хронической интоксикации ДХЭ.

Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на 24 здоровых половозрелых неинбредных белых крысах-самцах массой 180–220 г, разделенных на 3 группы: 1-я – контрольная (n=8), 2-я и 3-я – животные с моделированной интоксикацией дихлорэтаном (n=8 в каждой группе) соответственно на 30 и 60 сутки исследования. Эксперименты проводились в соответствии с требованиями приказов № 1179 МЗ СССР от 10.10.83 г., № 267 МЗ РФ от 19.06.03 г. «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», «Правила по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных». Хроническая интоксикация дихлорэтаном достигалась ежедневным энтеральным введением токсиканта в растворе оливкового масла в дозе 5 мг/кг (0,01 LD_{50}) в течение 60 суток. Контрольные животные получали внутрижелудочно равный объем оливкового масла. За 24 часа до умерщвления животных лишали пищи. Эксперименты выполнялись в зимний период времени. Забор биологического материала производился в утренние часы. Объектом исследования служила плазма крови. Для исследования кровь собирали из сердца методом кардиопункции под легким эфирным наркозом, после чего животных подвергали декапитации. Тестирование осуществляли на 30 и 60 сутки.

О содержании оксида азота (NO) в плазме крови судили по количеству стабильных конечных метаболитов NO, а именно – NO_2^-+ NO_3^- (UNO_X). Принцип метода заключается в одномоментном восстановлении нитратов в нитриты в присутствии VCl_3 и реакции диазотирования образовавшимся нитритом сульфаниламида с развитием розовой окраски [7].
За неделю до определения метаболитов NO животных переводили на низконитратную диету, с исключением других внешних источников нитратов.

Определение уровня эндотелина-1 в плазме крови проводили иммуноферментным методом с использованием набора Endotelin (1-21), фирмы «Biomedica» (Австрия) на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 2100. Для этого набор Endotelin (1-21) включает очищенные поликлональные захватывающие антитела и моноклональные детектирующие антитела, специфичные к эндотелину. На первом этапе проба плазмы и детектирующие антитела одновременно вносятся в ячейки. Эндотелин 1, присутствующий в образце плазмы, связывается с захватывающими антителами в ячейках и образует сэндвич – комплекс с детектирующими антителами. После промывки ячеек и удаления неспецифически связанного материала в ячейки добавляли комплекс из пероксидазы с антителами, который позволяет обнаружить связанные антитела. После удаления несвязавшегося коньюгата в ячейки вносили ферментный субстрат – 3,3 –5,5 – Tetramethyl benzidine / Hydrogen Peroxide. По интенсивности развивающейся окраски,

которая прямо пропорциональна содержанию эндотелина (1–21) в пробе плазмы крови судили об уровне эндотелина [17].

Количество ЦЭК в крови определяли по методу [9]. Принцип метода основан на изоляции клеток эндотелия вместе с тромбоцитами с последующим осаждением тромбоцитов с помощью аденозиндифосфата (АДФ). Количество клеток эндотелия подсчитывали в 2 сетках камеры Горяева методом фазово-контрастной микроскопии. Учитывая соотношение между количеством клеток в сетке и объемом камеры Горяева, объема полученной суспензии и объема плазмы, при подсчете количества эндотелиальных клеток результат умножали на 10^4/л.

Обработку полученных результатов проводили с применением методов вариационной статистики. После проверки нормальности распределения изучаемых параметров в сравниваемых группах тестом Shapiro-Wilk определяли средние величины (M), ошибку средних величин (m) при соответствии распределения признака закону нормального с расчетом сравнения групп показателей по критерию Стьюдента (t). Минимальный уровень статистической значимости различий верифицировали при $p<0,05$. Взаимосвязь признаков оценивали с помощью корреляционного анализа по Пирсону. Математическую обработку выполняли на компьютере с применением стандартных пакетов программы Statistica 6.0 (Stat Soft).

Результаты исследования и их обсуждение

Сосудистый эндотелий является важным метаболическим органом, который поддерживает гомеостаз, регулируя тонус сосудов, их анатомическое строение, гемостаз, воспалительные реакции. Повреждение эндотелиоцитов молекулами средней массы, цитокинами, продуктами перекисного окисления липидов (ПОЛ), липополисахаридом (эндотоксином) нарушает синтез медиаторов, которые обеспечивают нормально течение эндотелизависимых процессов [11, 19]. Среди важнейших эндотелиальных факторов, дисбаланс которых приводит к дисфункции эндотелия, относят эндотелины и оксид азота. Эндотелины – эндотелиальные пептиды, которые обладают мощным вазоактивным действием. Известны 3 изоформы эндотелинов, отличающиеся друг от друга вариациями аминокислотной последовательности. Самый изученный представитель этого класса – эндотелин-1 - полипептид с комбинацией 21 аминокислоты.

Определение содержания эндотелина-1 (ЭТ-1) в крови экспериментальных животных продемонстрировало незначительное повышение его уровня на 30 сутки хронической интоксикации ДХЭ, а на 60 сутки уровень ЭТ-1 возрос на 38,84 % ($p<0,05$) по сравнению с животными контрольной группы (таблица). В физиологических условиях эндотелин-1, образуясь в небольшом количестве, является модулятором тонуса сосудов, клеточного роста, пролиферации, рилизинга катехоламинов из надпочечников [4]. При повреждении эндотелий

синтезирует большое количество эндотелина-1, который приводит к значительным изменениям гемодинамики, а также стимулирует продукцию макрофагами ИЛ-1, ИЛ-6, Ил-8, влияя на течение воспалительного процесса [20]. Выделение эндотелина-1 в основном обусловлено повреждением эндотелиальных клеток, гипоксическим поражением тканей, а также ростом уровня вазодилататоров для обеспечения регуляторного равновесия. Из данных литературы известно, что полупериод жизни эндотелина-1 составляет 10–20 минут, а в плазме крови – 4–7 минут [2, 11, 17]. В условиях хронической интоксикации ДХЭ обнаружено стойкое увеличение содержания эндотелина-1 на 60 сутки, которое не связанно с ростом уровня вазодилататоров, что может свидетельствовать о развитии эндотелиальной дисфункции.

Содержание эндотелина-1, стабильных метаболитов оксида азота и циркулирующих эндотелиальных клеток в плазме крови у крыс при хронической интоксикации дихлорэтаном, (M±m)

Исследуемый показатель	Группы животных		
	1-я группа, (n=8)	2-я группа, (n=8)	3-я группа, (n=8)
UNO_X, мкмоль/л	38,46±2,28	45,58±2,43 P_1 = 0,051	27,9±2,23 P_1=0,0052 P_2=0,0001
Эндотелин-1, фмоль/мл	7,26±0,41	8,36±0,77 P_1 =0,23	10,08±0,59 P_1 =0,00153 P_2=0,099
ЦЭК, х 10^4/л	3,7±0,35	3,9±0,58 P_1 =0,77	6,42±1,0 P_1 =0,0227 P_2=0,047

Примечание: P_1 – достоверность по сравнению с первой (контрольной) группой;
P_2 – достоверность 3-й группы по сравнению со второй группой.

Изменения содержания оксида азота у крыс при хронической интоксикации ДХЭ имело разную направленность. Максимальный уровень NO был зафиксирован у крыс на 30 сутки интоксикации ДХЭ. Содержания суммы его стабильных метаболитов в плазме крови у крыс данной группы составило 45,58 мкмоль/л, что превышало показатели контрольной группы на 18,5 % (p>0,05). Повышенную выработку оксида азота на 30 сутки хронической интоксикации ДХЭ можно рассматривать как компенсаторную реакцию, связанную в большей степени с окислительным стрессом, чем с ростом уровня ЭТ-1, а также с увеличением содержания провоспалительных цитокинов, что было продемонстрировано нами ранее [13]. Известно, что оксидантный стресс активирует нуклеарный фактор каппа-В (NF-кВ), повышает экспрессию адгезивных молекул эндотелия, способствующих развитию воспалительных процессов. Оксид

азота ингибирует экспрессию транскрипционного фактора NF-κB, подавляет адгезию моноцитов, тромбоцитов к сосудистой стенке, блокирует окисление липопротеидов низкой плотности.

Исследование концентрации нитратов и нитритов в сыворотке крови крыс на 60 сутки хронической интоксикации ДХЭ свидетельствовало об угнетении синтеза NO на 27,5 % ($p<0,05$), возможно, одной из причин которого является алкилирование NO-синтаз продуктами метаболизма ДХЭ. Известно также, что причиной пониженного уровня NO может быть накопление в крови ассиметричного диметиларгинина, который является эндогенным конкурентным ингибитором eNOS, а также окисленных липопротеидов низкой плотности (ЛНП) и усиление окислительного стресса. Показано, что супероксид-анион тормозит экспрессию и активность eNOS, а также обладает способностью связывать NO с образованием пероксинитрита – сильного окислителя. Усиление свободно-радикального окисления активирует процессы гиперкоагуляции и апоптоз эндотелиальных клеток [1, 16]. Кроме того, эндотелин-1 снижает продукцию и биодоступность оксида азота и экспрессию NO-синтазы в эндотелиальных клетках [20]. В исследованиях, выполненных нами ранее, при хронической интоксикации ДХЭ установлено повышение уровня продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), ухудшение показателей антиоксидантной защиты и изменения в фосфолипидном составе, которые характеризовались увеличением содержания лизофосфатидилхолина (ЛФХ) и сфингомиелина (СфМ). По данным ряда авторов накопление ЛФХ нарушает транспорт L-аргинина в эндотелиальные клетки, уменьшая образование NO, и снижает его биодоступность [1]. Установленное нами ранее увеличение содержания вторичного продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида может вызвать окислительную модификацию ЛНП. Детализация причин пониженного уровня NO при хронической интоксикации ДХЭ требуют дальнейшего изучения.

Важным показателем для оценки степени повреждения эндотелия сосудов является определение количества в крови циркулирующих эндотелиальных клеток. По данным ряда авторов в повреждении эндотелия выделяют 3 стадии. Первая – повреждение гликокаликса эндотелия, вторая – увеличение проницаемости эндотелия, третья – повреждение эндотелия. Повреждающими эффектами являются: перегрузка клеток эндотелия кальцием, повреждение клеточных мембран, истощение энергетических ресурсов, ишемическое повреждение тканей за счет вазоспазма, избыточная пролиферативная активность на фоне иммунодефицита [15]. При изучении выраженности десквамациии эндотелия было установлено, что количество ЦЭК в плазме крови крыс на 30 сутки хронической интоксикации ДХЭ значительно не отличалось от контрольных показателей, а на 60 сутки их уровень увеличился на 73,5 % ($p<0,05$). Можно

предположить, что на 30 сутки наблюдаются 1 и 2 стадии повреждения эндотелия, а на 60 сутки выявляются признаки морфологического повреждения клеток эндотелия сосудов. Проведенный корреляционный анализ выявил значительную прямую зависимость количества ЦЭК от уровня эндотелина-1 (r= +0,69; P=0,065) и умеренную обратную взаимосвязь между количеством ЦЭК и содержанием стабильных конечных метаболитов NO (r= –0,43; P=0,28) на 60 сутки хронической интоксикации ДХЭ. Данные результаты можно объяснить тем, что уровень оксида азота в меньшей степени зависит от повреждения эндотелиоцитов, чем уровень эндотелина-1.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования показали, что в условиях длительного введения ДХЭ имеются признаки нарушения функции эндотелия (снижение выработки оксида азота, повышения эндотелина-1) и его повреждения (увеличение количества ЦЭК). Полученные нами научные факты свидетельствуют о том, что выраженность эндотелиальных нарушений зависит от длительности введения ДХЭ.

Список литературы

1. Дзугкоев С.Г. Изменение биохимических показателей крови на фоне регуляторов экспрессии эндотелиальной NO-синтазы при кобальтовой интоксикации / С.Г. Дзугкоев, И.В. Можаева, Л.В. Гиголаева [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная медицина. – 2014. – Т. 58. – № 4. – С. 66-70.
2. Иванов А.Н. Влияние терагерцовых волн на частотах молекулярного спектра оксида азота 150+0,75 ГГЦ на изменение продукции и механизмов регуляции эндотелина-1 у крыс самцов, находящихся в состоянии острого и длительного стресса / А.Н. Иванов, В.Ф. Киричук, М.О. Куртукова [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2009. – Т. XVI.– № 4. – С. 19-21.
3. Козлов В.А. Активность цитохром Р-450-зависимых монооксидаз функции иммунокомпетентных клеток / В.А. Козлов, Г.Ю. Любимов, Н.Н. Вольский // Вестн. Акад. мед. наук СССР. – 1991. – № 12. – С. 8-12.
4. Корякина Л.Б. Эндотелий (функциональные особенности, дисфункция, способы коррекции) / Л.Б. Корякина, Е.О. Андреева, Э.Э. Кузнецова Э.Э. [и др.] // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2005. – № 4 (24). – С. 3-11.
5. Лужников Е.А. Острые отравления: Руководство для врачей 2-е изд., перераб. и доп. / Е.А. Лужников, Л.Г. Костомарова. – М.: Медицина, 2000. – 434 с.

6. Марков Х.М. Молекулярные механизмы дисфункции сосудистого эндотелия / Х.М. Марков // Кардиология. – 2005. – № 12. – С. 62-72.

7. Метельская, В.А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови / В.А. Метельская, Н.Г. Гуманова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 6. – С. 15-18.

8. Милош Т.С. Состояние эндотелия сосудов и прооксидантно-антиоксидантный баланс у беременных крыс в условиях эндотоксинемии / Т.С. Милош, Н.Е. Максимович // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2015. – Т. 59. – № 1. – С. 59-63.

9. Петрищев Н.Н. Диагностическая ценность определения десквамированных эндотелиальных клеток в крови / Н.Н. Петрищев, О.А. Беркович, Т.Д. Власов Т.Д. [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 1. – С. 50-52.

10. Петрищев Н.Н. Дисфункция эндотелия. Патогенетическое значение и методы коррекции / Под ред. Н.Н. Петрищева. – СПб.: ИИЦ ВМА, 2007. – 296 с.

11. Сергиенко В.И. Эндотелиальная дисфункция и методы ее коррекции при экспериментальном желчном перитоните / В.И. Сергиенко, Э.А. Петросян, О.А. Терещенко [и др.] // Хирургия. – 2012. – № 3. – С. 54-58.

12. Срубилин Д.В., Еникеев Д.А. Активация процессов перекисного окисления липидов в слизистой тонкой кишки в механизмах формирования эндогенной интоксикации при длительном поступлении дихлорэтана // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10-9. – С. 1805-1810.

13. Срубилин Д.В., Еникеев Д.А., Мышкин В.А. Изменения цитокинового профиля и активности процессов перекисного окисления липидов в крови крыс в механизмах формирования воспалительного ответа при хронической интоксикации дихлорэтаном // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5.; URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21763 (дата обращения: 15.09.16).

14. Титов В.Н. Анатомические и функциональные основы эндотелий-зависимой вазодилатации, оксид азота и эндотелин / В.Н. Титов // Российский кардиологический журнал. – 2008. – Т. 69. – № 1. – С. 71-85.

15. Чубуков Ж.А. Фактор Виллебранда и дисфункция эндотелия при стрессе / Ж.А. Чубуков // [электронный ресурс]. – Режим доступа: URL: http://cyberleninka.ru/article/n/faktor-villebranda-i-disfunktsiya-endoteliya-pri-stresse (дата обращения: 12.09.16).

16. Якушев В.И. Влияние антиоксидантов на эндотелиальную дисфункцию при моделировании L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота / В.И. Якушев, Н.В. Стабровская, В.А. Рагулина [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2010. – № 9 (123). – С. 186-190.

17. Kinugawa T. Plasma Endothelin-1 levels and clinical correlates in patients with chronic heart failure / T. Kinugawa, M. Kato, K. Ogino [et al.] // J. Card. Fail. – 2003. – V. 9 (4). – P. 318-324.

18. Meigs J.B. Biomarkers of endothelial dysfunction / J.B. Meigs, N Rifai // JAMA. – 2004. – No. 297. – P. 1978-1986.

19. Nagy J. Endothelial dysfunction / J. Nagy, B. Csiky, T. Kovacs, I. Wittmann // Orv. Hetil. – 2001. – Vol. 142(31). – P. 1667-1672.

20. Ruetten H., Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone / H. Ruetten, C. Thiemermann // J. Physiol. Pharmacol. – 1997. – No. 48. – P. 675-688.

21. Yllner S. Metabolism of 1,2-dicloroethane ^{14}C in the mouse / S. Yllner // Acta pharmacol. et toxicol. – 1971. – V. 30. – No. 4. – P. 257-265.