

## РОЛЬ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В НАРУШЕНИИ ФУНКЦИИ ВИСЦЕРАЛЬНЫХ ОРГАНОВ И ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИ ОБОСНОВАННЫЙ СПОСОБ КОРРЕКЦИИ

Дзугкоева Ф.С., Дзугкоев С.Г.

*Учреждение Российской академии наук Институт биомедицинских исследований ВНИЦ РАН и Правительства РСО-Алания, Владикавказ  
e-mail: elena\_takoeva@mail.ru*

При экспериментальном сахарном диабете (ЭСД) развивается окислительный стресс, повышается концентрация МДА в плазме крови, гомогенатах почечной, печеночной и миокардиальной ткани. Все это происходит на фоне нарушения антиокислительного потенциала клеток, что сопровождается угнетением активности Na,K-АТФ-азы в клетках этих висцеральных органов. Формируется дисфункция эндотелия, снижается концентрация суммарных метаболитов оксида азота, средняя и систолическая скорость кровотока в сосудах микроциркуляции, повышаются упруго-эластические свойства (PI) и удельное периферическое сосудистое сопротивление (индекс Пурсело). На фоне лечения препаратом убихинон-композитум восстанавливается окислительно-восстановительный потенциал клеток, концентрация оксида азота (NO), что способствует уменьшению микроциркуляторных гемодинамических нарушений, повышению активности Na,K-АТФ-азы в почечной, печеночной и миокардиальной ткани. Следовательно, включение убихинона в ц.п.э. способствует более полному восстановлению кислорода, ингибированию продукции супероксид анион-радикала ( $O_2^-$ ), увеличению синтеза АТФ, повышению активности натрий-транспортирующего фермента, а также повышению концентрации оксида азота в плазме крови.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, антиокислительная система, почки, печень, сердце, убихинон композитум

**Введение.** Патогенетической основой формирования сосудистых осложнений и патологии висцеральных систем при сахарном диабете (СД) является развитие эндотелиальной дисфункции. Открытие роли эндотелия в регуляции сосудистого тонуса и понимание механизма нарушений при патологии, в частности СД, позволяет полагать, что эндотелий становится прямой мишенью для повреждения. Ведущее значение в формировании дисфункции эндотелия придается повреждающему действию гипергликемии, с которым связаны неферментативное гликозилирование белков, полиоловый путь метаболизма глюкозы и способность гипергликемии индуцировать свободно-радикальное окисление (СРО) в печени, сердечной мышце, почках [1, 2, 3, 4]. В условиях окислительного стресса нарушение функции эндотелия может быть обусловлено либо сниженной продукцией эндотелиальными клетками (ЭК) оксида азота NO, либо нарушением его био-

доступности как важнейшего вазодилатирующего фактора. В свою очередь, сниженная продукция NO может быть связана с низкой экспрессией фермента эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), с его пониженной активностью или ускоренным распадом NO [5], так как взаимодействие NO с супероксиданион радикалом ( $O_2^-$ ) происходит в 3 раза быстрее, чем реакция дисмутации  $O_2^-$  – супероксиддисмутазой (СОД). Образующийся при этом пероксинитрит оказывается повреждающим фактором. Причем следует отметить, что нарушения носят системно-органный характер. При стрептозотоциновом СД уровень карбонильных производных белков (КПБ) в сердце крысы повышен на 20% от контрольных значений [7]. В сердце повышена активность СОД и каталазы, что может отражать компенсаторную индукцию их синтеза в ответ на активацию свободно-радикальных (СР) процессов. Считается, что окислительное повреждение митохон-

дрий в клетке лежит в основе различных патологий, и антиоксиданты (АО), действующие избирательно на митохондрии, могут оказывать корригирующий эффект. Митохондриальный АО SKQ1 останавливает деструктивные изменения в клетках тканей, сопровождающие развитие патологического процесса по данным ультраструктуры митохондрий [8, 9]. Поэтому весьма актуальным является исследование показателей активности ПОЛ и антиокислительной системы (АОС) в крови и клетках висцеральных органов, а также разработка возможного пути коррекции нарушений с применением митохондриально-ориентированного антиоксиданта – убихинон композитума при экспериментальном сахарном диабете (ЭСД).

**Цель исследования:** изучить показатели окислительного стресса и содержания стабильных метаболитов NO, характера микроциркуляторных изменений и активности Na,K-АТФ-азы висцеральных органов, обосновать и разработать патогенетически обоснованную корригирующую терапию на фоне сахарного диабета.

#### Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 105 крысах-самцах линии Вистар одной возрастной группы (10-14 месяцев), массой 220-250 г. Содержание крыс в виварии и проведение экспериментов соответствовали «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», разработанным и утвержденным 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%-ного водного раствора аллоксана в дозе 15–18 мг/100 г массы животного на фоне 24–48-часового голодания. Развитие диабета контролировали по уровню глюкозы крови, который определяли глюкозооксидазным методом, и гликированного гемоглобина, определяемого с помощью тест-наборов фирмы «БиоХимМак». Модель считалась состоявшейся при повышении уровня глюкозы крови и диуреза более чем в 2 раза. Животных брали в опыт по окончании остротоксического периода действия аллок-

сана, т.е. спустя 14 дней с момента развития ЭСД. В качестве объектов исследования использовали кровь, эритроциты, гомогенаты коркового и мозгового вещества почечной ткани, а также печени и миокарда. Об интенсивности ПОЛ в мембранах эритроцитов и в гомогенатах тканей судили по изменению концентрации конечного продукта этого процесса – малонового диальдегида (МДА), которую определяли колориметрически с тиобарбитуровой кислотой. Состояние антиоксидантной системы оценивали по активности каталазы и СОД в сыворотке крови и эритроцитах, определяемой методом аутоокисления адреналина. Содержание в плазме крови стабильных суммарных конечных метаболитов оксида азота ( $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  или  $\text{NO}_x$ ) определяли с помощью реактива Грисса в реакции диазотирования, согласно модифицированному экспресс-методу [6]. Активность Na,K-АТФ-азы определяли по приросту концентрации неорганического фосфора в пробе при добавлении АТФ и инкубации с гомогенатами коркового и мозгового вещества почек, печени и миокарда. Удельную активность фермента рассчитывали на мг белка в час (мкмоль/ФН/мг белка/час). Белок в пробах определяли по методу Lowry. Макро- и микрогемодинамику исследовали ультразвуковым доплерографом ММ-Д-Ф (Санкт-Петербург, Россия). У наркотизированных животных использовали 6 основных точек локации: брюшная аорта (БА), нижняя полая вена (НПВ), почечная артерия (ПАпр, ПАлев), микроциркуляторное звено. В каждой точке локации определяли  $M$  (средняя скорость, см/с),  $S$  (систолическая скорость, см/с),  $D$  (диастолическая скорость, см/с),  $Pi$  (пульсовой индекс, см/с),  $GD$  (градиент давления, мм рт.ст) и рассчитывали  $RI$  (реографический индекс, у.ед). Все исследования проводили до и на фоне введения экспериментальным животным комплексного гомеопатического препарата убихинон композитум (Биологише Хайльмиттель Хеель ГмБХ, Германия). Препарат вводили подкожно в дозе 0,11 мкл/100 г массы животного 1 раз в сутки в течение 30 дней. Статистическую обработку результатов и корреляционный анализ проводили с помощью программы Microsoft Excel 2003. Результаты представ-

лены в виде среднего значения (Mean) и ошибки среднего (SEM). Статистическую достоверность различий между двумя группами животных проверяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Уровнем статистической значимости считали  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

При ЭСД у животных развивается гипергликемия, уровень которой превышает аналогичный показатель контрольной группы почти в три раза ( $14,32 \pm 0,03$  против  $4,66 \pm 0,03$  ммоль/л;  $p < 0,001$ ). У животных с ЭСД по сравне-

нию с контрольной группой повышено и содержание гликированного гемоглобина (HbA1c), который отражает уровень гликемии за последние 1-3 месяца ( $8,6 \pm 0,71\%$  против  $5,3 \pm 0,81\%$ ;  $p < 0,001$ ). У крыс с ЭСД активируются процессы ПОЛ клеточных мембран, о чем свидетельствует статистически достоверное повышение концентрации МДА в мембранах эритроцитов, гомогенатах коркового и мозгового вещества, а также печени и миокарда. Одновременно происходило снижение активности СОД в сыворотке крови, эритроцитах и компенсаторное возрастание активности каталазы (таблица).

### Изменение концентрации МДА, метаболитов оксида азота, активности ферментов АОС, Na, К-АТФ-азы висцеральных органов и микрогемодинамики при экспериментальном сахарном диабете

Показатель	Контроль	ЭСД (до лечения)	ЭСД (после лечения)
МДА (корк. слой почек), нмоль/мг белка	3,18±0,22	4,39±0,18 <sup>aaa</sup>	3,47±0,08 <sup>bbb</sup>
МДА (мозг. слой почек), нмоль/мг белка	4,28±0,13	6,62±0,17 <sup>aaa</sup>	4,99±0,28 <sup>bbb</sup>
МДА (печень)	1,863±0,047	2,248±0,063 <sup>aaa</sup>	1,277±0,04 <sup>bbb</sup>
МДА (сердце)	2,439±0,067	2,703±0,066 <sup>aa</sup>	2,464±0,084 <sup>bbb</sup>
МДА (в эритроцитах)	6,87±0,45	8,65±0,47	4,19±0,072 <sup>aaa</sup>
Активность СОД, ед.	2,55±0,46	1,45±0,04 <sup>aa</sup>	1,88±0,10 <sup>bbb</sup>
Активность каталазы, мкат/л	225,6±29,1	345,3±3,3 <sup>aaa</sup>	329,5±4,8 <sup>aaa,bbb</sup>
Na,К-АТФ-аза (корковый слой), мкмоль/Рн/мг/час	4,39±0,18	3,18±0,22 <sup>aaa</sup>	3,82±0,13 <sup>bb</sup>
Na,К-АТФ-аза (мозговой слой), мкмоль/Рн/мг/час	6,62±0,35	4,38±0,15 <sup>aaa</sup>	5,37±0,26 <sup>bbb</sup>
Na,К-АТФ-аза (печень), мкмоль/Рн/мг/ч	1,2±0,035	0,98±0,048 <sup>aa</sup>	2,21±0,1 <sup>bbb</sup>
Na,К-АТФ-аза (сердце), мкмоль/Рн/мг/ч	2,32±0,07	1,86±0,06 <sup>aaa</sup>	2,03±0,061 <sup>bb</sup>
NO <sub>x</sub> , мкМ	51,069±0,531	32,54±1,425 <sup>a</sup>	51,594±1,813
Средняя скорость кровотока (M), см/с	2,52±0,076	2,14±0,064 <sup>aaa</sup>	2,63±0,22 <sup>bbb</sup>
Систолическая скорость (S), см/с	11,34±0,26	1048±0,17 <sup>aa</sup>	11,33±0,34 <sup>bb</sup>
Диастолическая скорость (D), см/с	6,34±0,17	6,25±0,22	5,95±0,28 <sup>bb</sup>
Индекс Гослинга (Pi), см/с	7,67±0,25	9,50±0,23 <sup>aaa</sup>	8,02±0,75 <sup>bb</sup>
Градиент давления (GD), мм рт.ст.	0,042±0,001	0,04±0,001	0,042±0,003
Реографический индекс (RI), у.ед.	1,49±0,036	1,572±0,03 <sup>a</sup>	1,45±0,03 <sup>aaa,bbb</sup>

Примечание: <sup>a</sup> –  $p < 0,05$ ; <sup>aa</sup> –  $p < 0,01$ ; <sup>aaa</sup> –  $p < 0,001$  (по сравнению с контролем), <sup>b</sup> –  $p < 0,05$ ; <sup>bb</sup> –  $p < 0,01$ ; <sup>bbb</sup> –  $p < 0,001$  (по сравнению с исходными значениями до введения препарата)

У крыс с ЭСД развивается окислительный стресс, который приводит к сниженной продукции NO эндотелиальными клетка-

ми либо его ускоренному распаду. Данные показали, что у крыс с ЭСД концентрация суммарных метаболитов NO оказалась ста-

тистически достоверно пониженной сравнительно с контрольными животными, что сопровождалось преобладанием вазоконстрикторных влияний. Это проявлялось повышением сосудистого тонуса и нарушениями микроциркуляции, о чем свидетельствуют данные гемодинамики, представленные в этой же таблице. Данные перфузии тканей показали, что при ЭСД во всех точках локации выявлено снижение средней скорости кровотока (M) вследствие снижения систолической скорости кровотока (S) при повышении диастолической скорости кровотока (D). Реографические показатели характеризуются более высокими значениями индекса Гослинга, отражающего повышение упруго-эластических свойств (плотности) сосудистой стенки, и снижением градиента давления в сосудах микроциркуляторного русла. Индекс Пурсело (реографический индекс RI), который отражает удельное периферическое сосудистое сопротивление (УПСС), у животных с ЭСД был статистически достоверно выше, чем в контроле. Эти результаты свидетельствуют о преобладании вазоконстрикторных влияний в микроциркуляторном русле, обусловленных, по нашим данным, снижением содержания метаболитов оксида азота в крови у диабетических крыс. Нарушение микрогемодинамики в результате эндотелиальной дисфункции у экспериментальных животных в хронической стадии аллоксанового диабета сопровождается статистически достоверным снижением активности ион-транспортующего фермента Na,K-АТФ-азы в гомогенатах почек, печени и миокарда. Для коррекции избыточного процесса ПОЛ, нарушений системы антиоксидантной защиты и активности Na,K-АТФ-азы в почечной, печеночной ткани, а также сердечной мышце крысам с ЭСД в течение месяца вводили убихинон композитум. Введение препарата сопровождалось существенным снижением концентрации МДА в эритроцитах и корковом и мозговом веществе почечной ткани, в гомогенатах печени и миокарда. На фоне введения препарата повысилась активность ферментов антиоксидантной защиты. Активность СОД сыворотке крови и эритроцитах практически восстановилась до уровня

контроля, а каталазы – статистически значительно снизилась, но не достигла уровня, характерного для контрольных животных. Следовательно, в условиях окислительного стресса выявлено компенсаторное повышение активности каталазы, катализирующей превращение перекиси водорода в молекулу воды и кислорода. Проведен корреляционный анализ для выяснения эффективности действия антиоксидантов на процессы ПОЛ и ферменты антиоксидантной защиты. Показано наличие прямой сильной корреляционной связи между концентрацией МДА и активностью каталазы ( $r = +0,64$ ,  $p < 0,001$ ) и отрицательной сильной связи между уровнем снижения концентрации МДА и повышением активности СОД ( $r = -0,54$ ;  $p = 0,03$ ). Введение животным с ЭСД препарата убихинон композитум сопровождалось повышением активности Na,K-АТФ-азы в корковом и мозговом веществе почечной ткани, гепатоцитах и кардиомиоцитах. Этому способствовали нормализация липидного микроокружения фермента в результате ингибирования ПОЛ в мембранах клеток висцеральных органов, повышение эффективности использования кислорода в цепи переноса электронов и энергообразования. Препарат убихинон композитум положительно влиял на функциональную активность сосудистого эндотелия, способствовал повышению концентрации метаболитов NO в сыворотке крови у животных с ЭСД, в течение месяца получавших этот препарат. Коррекция дисфункции эндотелия препаратом Убихинон композитум сопровождалась статистически достоверным снижением удельного периферического сопротивления и упруго-эластических свойств сосудов микроциркуляторного русла и повышением перфузии вследствие возрастания средней и систолической скоростей кровотока. Корреляционный анализ показал отрицательную связь средней силы между концентрацией метаболитов NO и скоростью кровотока ( $r = -0,41$ ;  $p = 0,03$ ).

**Выводы.** Таким образом, можно полагать, что убихинон композитум угнетает образование активных форм кислорода (АФК), оказывает регулирующее влияние на дыхательную цепь, повышает энергообразование и активность фермента антиоксидантной за-



щиты клеток – СОД. Восстановление функции эндотелиальных клеток приводило к повышению функциональной способности клеток почечной, печеночной ткани и миокарда по данным повышения активности мембраносвязанного фермента Na,K-АТФазы. Следовательно, препарат убихинон комpositum снижает проявления микрососудистых осложнений СД, включая патологию висцеральных органов, работая на уровне митохондрий в цепи переноса электронов.

#### Список литературы

1. Александровский Я.А. (2005) Сахарный диабет. Эксперименты и гипотезы. – М: СИП РИА, 2005. – 220 с.
2. Бондарь И.А., Климонтов В.Р., Поршеников И.А. Окислительная модификация белков при диабетических микроангиопатиях // Сахарный диабет. – 2000. – №3. – С. 9.
3. Бакеева Л.Е. и др. Ультраструктура митохондрий в условиях эндогенного окислительного стресса, защитное действие митохондриального антиоксиданта SKQ1 // Материалы IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, 11-15 мая. – Новосибирск, 2008. – С. 574.
4. Волчегорский И.А., Рассохина Л.М., Мирошниченко И.Ю. Антиоксиданты при экспериментальном сахарном диабете // Проблемы эндокринологии. – 2008. – №54(5). – С. 43–50.
5. Высокогорский В.Е., Индутный А.В., Быков Д.Е. Карбонильная модификация белков и активность антиокислительных ферментов сердца при сочетании сахарного диабета с хронической интоксикацией алкоголем // Материалы IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, 11-15 мая. – Новосибирск, 2008. – С. 451.
6. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови человека // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – №6. – С. 15–8.
7. Сулова Т.Е., Груздева О.В., Крещенко С.В. и др. Оксид азота, антиоксидантная активность плазмы крови и агрегация тромбоцитов у больных с сочетанием сахарного диабета типа 2 и артериальной гипертензии // Материалы IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, 11-15 мая. – Новосибирск, 2008. – С. 461.
8. Asakawa T., Matsushita S. Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipidhydroperoxides // Lipids. – 1980. – №15(3). – P. 137-40.
9. Dunlop M. Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic neuropathy // Kidney Int. Suppl. – 2000. – №77. – P. 3-12.

## ROLE OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN VIOLATION OF THE VISCERAL ORGANS AND PATOGENETICHESKI THE METHODS CORRECTION

**Dzugkoeva F.S., Dzugkoev S.G.**

*Establishment of the Russian Academy of Sciences Institute of Biomedical Research VRC RAS and the government of North Osetia-Alania  
e-mail: elena\_takoeva@mail.ru*

At experimental diabetes mellitus (EDM) the oxidizing stress develops, the concentration of MDA in a blood plasma, homogenates of renal, hepatic and heart tissues increases. All this occurs on a background of infringement of antioxidizing potential of cells. It is accompanied by oppression of activity of Na,K-ATP-ase in the cells of these internal organs. Dysfunction of an endothelium is formed; concentration of total metabolites of nitric oxide, average and systolic speed of a blood flow in vessels of microcirculation decreases; the elastic properties (PI) and specific peripheral vascular resistance (index Purselo) increases.

On a background of treatment the preparation Ubichinon compositum restores oxidation-reduction potential of cells and the concentration of nitric oxide (NO), that promotes reduction of microcirculation hemodynamic infringements, increases of activity of Na,K-ATP-ase in renal, hepatic and heart tissues. Hence, the inclusion of Ubichinon in the circuit of carry of electrons (cce) promotes fuller restoration of oxygen, inhibition of production of superoxide anion radical ( $O_2^-$ ), the increase in the ATP synthesis, increase of activity of the Na-transporting enzyme, and also the increase of concentration of nitric oxide.

Keywords: lipid peroxide oxidation (LPO), antioxidizing protection, kidneys, a liver, heart, Ubichinon compositum