

УДК 616-005.1-08:569.323.4

МОДЕЛИРОВАНИЕ ОСЛАБЛЕНИЯ СОСУДИСТОГО КОНТРОЛЯ НАД ИНТРАВАСКУЛЯРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ТРОМБОЦИТОВ У КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СОЗДАНИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

Солдатова О.А.*Курский институт социального образования (филиал) РГСУ, Курск, e-mail: ilmedv1@yandex.ru*

Цель – рассмотреть в условиях экспериментального формирования метаболического синдрома процесс развития ослабления сосудистого контроля над внутрисосудистой активностью тромбоцитов. В исследование включена 61 крыса. Это самцы линии Вистар в возрасте 2,5–3 мес., полученные от здоровых самок первым-вторым пометом. Животные были разделены на 2 группы: 32 крысы были взяты в эксперимент и получали в свободном доступе в качестве питья 10% раствор фруктозы, приготовленный из кристаллической фруктозы, а 29 крыс составили группу контроля. Эксперимент продолжался 8 недель. Применены биохимические, гематологические и статистические методы исследования. В экспериментальных условиях фруктозной нагрузки выяснено, что одновременно с нарастанием массы тела и развитием биохимических нарушений, свойственных для метаболического синдрома, возникает углубляющееся ослабление антиагрегационного контроля сосудистого эндотелия над внутрисосудистой активностью тромбоцитов за счет депрессии продукции в нем простациклина и оксида азота. Полученные сведения способны послужить основой для клинических исследований, направленных на уточнение патогенетически оправданного момента начала коррекционных воздействий у лиц с ранними признаками метаболического синдрома.

Ключевые слова: крысы, фруктоза, метаболический синдром, сосуды, гемостаз

SIMULATION OF VASCULAR ATTENUATION CONTROL INTRAVASCULAR PLATELET ACTIVITY IN RATS WITH EXPERIMENTAL PRODUCING METABOLIC SYNDROME

Soldatova O.A.*Kursk Institute of social education (branch of the institute RSSU (Russian State Social University)),
Kursk, e-mail: ilmedv1@yandex.ru*

The goal – to consider in experimental form of the metabolic syndrome development of vascular attenuation control of intravascular platelet activity. The study included 61 male rats Wistar aged 2,5–3 months. Obtained from healthy females first, second litter. Animals were divided into 2 groups: 32 rats were taken in the experiment and obtained as a freely available drinking 10% fructose solution, prepared from crystalline fructose and 29 constituted the control group of rats. The experiment lasted 8 weeks. Applied biochemistry, hematology and statistical methods. Under experimental conditions, fructose load found that simultaneously with the increase in body weight and the development of biochemical abnormalities characteristic of metabolic syndrome, there is a deepening antiaggregat-ionnogo weakening control of the vascular endothelium of intravascular platelet activity due to the depression of products in it prostacyclin and nitric oxide. The findings can serve as a basis for clinical studies aimed at clarifying the pathogenesis justified since the start of the correction effects in people with early signs of metabolic syndrome.

Keywords: rat, fructose, metabolic syndrome, blood vessels, hemostasis

Оптимум функционирования сосудистого гемостаза во многом обеспечивает гомеостаз во всем организме млекопитающих [15]. Огромное значение для него имеют синтетические свойства сосудистого эндотелия, вырабатывающего различные биологически активные вещества, определяющие тонус сосудов, оптимум их морфологии, выраженность ограничивающих влияний на процессы гемостаза [2].

Продолжительные клинические и экспериментальные исследования первичного гемостаза дали возможность сформировать современные представления о механизмах его регуляции при различной патологии [6, 14], пролив свет на их динамику при изолированной артериальной гипертензии (АГ) [3, 14] и при все чаще встречающемся ее

сочетании с различными обменными нарушениями [7, 11, 12] и особенно с метаболическим синдромом (МС) [3, 4, 10, 13]. Стало ясно, что для АГ при МС свойственен измененный уровень образования в эндотелиоцитах гемостатически активных веществ (простациклина, фактора Виллебранда, оксида азота), во многом обеспечивающий высокую частоту при этом состоянии тромботических эпизодов [10, 14].

Для поиска подходов по сокращению проявлений вазопатии и минимизации риска тромбозов при АГ были проведены серьезные исследования по оценке отдельных механизмов развития дисфункций стенки сосудов и их роли в патогенезе АГ и МС [10, 13]. Вместе с тем особенности ранних изменений сосудистого контроля над

внутрисосудистой активностью тромбоцитов (ВАТ) в дебюте формирования МС нельзя считать окончательно выясненными. Невозможность до конца проследить этот процесс на человеке ввиду выпадения лиц с первыми признаками МС из поля зрения клиницистов диктует необходимость проведения экспериментальных исследований на лабораторных животных с моделированием у них МС [9]. Эти сведения способны послужить основой для клинических исследований, направленных на уточнение патогенетически оправданного момента начала коррекционных воздействий у лиц с ранними признаками МС. С учетом данных обстоятельств, в работе была сформулирована цель: рассмотреть в условиях экспериментального формирования метаболического синдрома процесс развития ослабления сосудистого контроля над ВАТ.

Материалы и методы исследования

В исследование включена 61 крыса. Это самцы линии Вистар в возрасте 2,5–3 мес., полученные от здоровых самок первым-вторым пометом. Масса тела животных на момент взятия в исследование составляла $261,1 \pm 1,18$ г, окружность их живота $14,7 \pm 0,26$ см. До исследования все крысы не участвовали ни в каких экспериментах и не переносили никаких заболеваний. Случайным образом все животные были разделены на 2 группы: 32 крысы были взяты в эксперимент и получали в свободном доступе в качестве питья 10% раствор фруктозы, приготовленный из кристаллической фруктозы (Новапродукт, Россия) [9], а 29 крыс составили группу контроля. Эксперимент продолжался 8 нед. Кровь у экспериментальных животных брали из хвостовой вены в исходе, через 2, 4, 6 и 8 нед. фруктозной нагрузки. Животные из группы контроля обследованы двукратно: в исходе и в возрасте 4,5–5 мес., т.е. одновременно с окончанием наблюдения за экспериментальными крысами. Ввиду отсутствия статистически значимых различий между результатами двух обследований контрольных крыс полученные данные представлены одной цифрой – их средней арифметической.

Масса тела животных определялась путем взвешивания на лабораторных весах и выражалась в граммах. Окружность живота выясняли путем измерения его охвата на уровне середины туловища, выражая в сантиметрах.

Концентрация общего холестерина (ХС) и триглицеридов (ТГ) выявлялась при помощи энзиматического колориметрического способа с использованием набора производства «Витал Диагностикум». Содержание в плазме ХС липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) выясняли энзиматически колориметрически при помощи набора производства «Ольвекс Диагностикум». Концентрации ХС липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и ХС липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) определяли расчетным путем.

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в жидкой части крови выявляли по количеству содержащихся в ней тиобарбитуровая кислота (ТБК)-активных продуктов набором «Агат-Мед» и по

содержанию ацилгидроперекисей (АГП) с учетом уровня антиокислительной активности (АОА) крови [1]. В плазме обследованных животных определяли содержание тромбоксана B_2 и 6-кето-простагландина $F_{1\alpha}$ путем иммуноферментного анализа при помощи наборов фирмы «Enzo Life science» (США). В крови наблюдавшихся крыс выявлялось суммарное содержание метаболитов оксида азота [8].

Состояние сосудистого контроля над ВАТ определяли в пробе с временной венозной окклюзией по ослаблению проявлений ВАТ, регистрируемой с применением фазового контраста [5]. Результаты статистически обработаны критерием (t) Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Исходно нормальная масса тела животных уже спустя 2 нед. эксперимента испытала тенденцию к росту, а с 4 нед. ее увеличение достигло уровня достоверности. Спустя 6 нед. употребления с питьевой водой фруктозы масса тела наблюдаемых крыс достигла $283,4 \pm 1,27$ г при величине окружности живота $16,4 \pm 0,19$ см, что свидетельствовало об увеличении у животных объема висцеральной жировой ткани. К моменту окончания эксперимента у наблюдаемых крыс выявлено дополнительное увеличение массы тела на 4,6%, окружности живота на 4,9%.

У крыс, получавших фруктозу, уже спустя 2 нед. отмечена тенденция к ухудшению липидного состава плазмы, а через 4 нед. она достигла уровня достоверности, в последующем прогрессивно ухудшаясь до окончания эксперимента. При этом уже через 2 нед. экспериментального воздействия у крыс найдено достоверное понижение АОА плазмы и нарастание в ней АГП и ТБК-активных продуктов, продолжавшееся в течение всего срока потребления фруктозы.

Исходно оптимальная концентрация метаболитов арахидоновой кислоты в плазме у крыс, получавших фруктозу, быстро нарушалась – уже через 4 нед. эксперимента найден их дисбаланс, достигший своего максимума к 8 нед. – тромбоксан B_2 суммарно возрос на 37,3%, при понижении 6-кето-простагландина $F_{1\alpha}$ на 21,8%. Это сопровождалось у наблюдаемых крыс понижением суммарного количества метаболитов оксида азота на 20,2%.

Уже через 2 нед. воздействия большинство характеристик ВАТ у экспериментальных крыс имели достоверную отрицательную динамику. Спустя 4 нед. потребления фруктозы все показатели ВАТ оказались достоверно усилены, что усугублялось до конца эксперимента. К 8 нед. наблюдения у них отмечено снижение дискоцитов до $61,3 \pm 0,24\%$ и нарастание всех активных форм кровяных пластинок до $38,7 \pm 0,23\%$.

В ходе эксперимента число свободно идущих по крови крыс мелких агрегатов ($14,6 \pm 0,08$ на 100 свободных тромбоцитов), а также средних и больших агрегатов ($2,3 \pm 0,06$ на 100 свободных тромбоцитов) также увеличилось.

На фоне проведения пробы с временной ишемией венозной стенки у экспериментальных крыс также выявлено неуклонное повышение числа активных кровяных пластинок и их агрегатов. Кроме того, в их плазме, взятой на фоне временной венозной окклюзии, количество дискоцитов за 8 нед. нагрузки фруктозой понизилось до $70,8 \pm 0,18\%$ при увеличении суммы активированных тромбоцитов, числа свободно плавающих по крови агрегатов любых размеров значимо возросли, что говорило о существенном ослаблении контроля сосудистой стенки над БАТ.

В настоящее время имеются достаточно полные представления об участии стенки сосудов в различных процессах, в т.ч. в развитии кардиальной патологии [2]. В современных цивилизованных странах МС является важной причиной инвалидизации и смертности [14]. В предшествующих исследованиях показано, что и высокое АД, и обменные нарушения участвуют в развитии весьма частых при МС сердечно-сосудистых осложнений [11, 15], делая изучение начальных этапов формирования вазопатии востребованным и теоретиками [6], и практиками медицины [14].

В результате свободного доступа наблюдаемых крыс к раствору фруктозы у животных отмечено быстрое повышение массы тела за счет скопления жировой ткани в абдоминальной области. Это происходило параллельно с нарушением липидного спектра крови животных и активацией в ней ПОЛ, свойственных для МС, и согласовывалось с предшествующими исследованиями [15]. Становилось ясно, что усиление ПОЛ в крови вызывало у крыс повреждение эндотелиоцитов, облегчавшее проникновение ХС в стенку сосуда, инициирующее атеросклероз и создающее условия для последующего тромбоза [13].

В ходе формирующегося МС у крыс отмечено нарастание синтеза тромбоксана A_2 при депрессии выработки антиагрегантов – простагличина и NO. Это являлось основой снижения ограничивающего влияния сосудистой стенки на БАТ. При этом избыточно образующийся в этих условиях на мембранах тромбоцитов плазменный тромбопластин ускоряет тромбообразование, ведет к дальнейшему росту агрегатов кровяных пластинок и ускорению образования на них волокон фибрина [5], постепенно ускоряя гемостаз.

У наблюдаемых животных можно констатировать постепенное ослабление контроля сосудов над плотностью тромбоцитарных рецепторов к коллагену Ia – IIa и VI, на что указывало понижение степени ослабления БАТ в условиях временной венозной окклюзии. Это сопровождается нарастанием активности фосфолипазы C, стимуляцией синтеза диацилглицерола и протеинкиназы C с последующим выраженным фосфолированием протеинов сократительной системы [7]. В этих условиях инозитолтрифосфат начинает все активнее стимулировать поступление Ca^{2+} из депо кровяных пластинок, способствуя все более выраженному сокращению актомиозина. Кроме того, избыточная адгезия кровяных пластинок у наблюдаемых животных была также связана с нарастанием в эксперименте синтеза в их сосудах фактора Виллебранда и усилением его взаимодействия с рецепторами к нему (Iv) – на мембране тромбоцитов [12]. При этом постепенно усиливающееся ослабление образования в сосудах NO и PGI_2 слабее взаимодействует с рецепторами их мембраны, что вызывает на них все более мощную экспрессию фибриногеновых рецепторов, постепенно усиливая активацию фосфолипазы A_2 , выщепляющей арахидоновую кислоту из фосфолипидов [14] для синтеза повышенного количества тромбоксана A_2 .

Заключение

В экспериментальных условиях фруктозной нагрузки выяснено, что одновременно с нарастанием массы тела и развитием биохимических нарушений, свойственных для МС, возникает углубляющееся ослабление антиагрегационного контроля сосудистого эндотелия над БАТ за счет депрессии продукции в нем простагличина и оксида азота.

Список литературы

1. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. – Челябинск; 2000. – 167 с.
2. Кутафина Н.В., Завалишина С.Ю. Механизмы функционирования сосудисто-тромбоцитарного гемостаза // Вестник РУДН, серия «Экология и безопасность жизнедеятельности». – 2012. – № 1. – С. 30–37.
3. Медведев И.Н., Громнацкий Н.И. Воздействие небиволола на агрегацию тромбоцитов больных артериальной гипертензией с метаболическим синдромом // Клиническая медицина. – 2005. – Т. 83, № 3. – С. 31–33.
4. Медведев И.Н., Громнацкий Н.И. Возможности нормодипина в коррекции реологических свойств тромбоцитов у больных артериальной гипертензией с метаболическим синдромом // Терапевтический архив. – 2005. – Т. 77, № 6. – С. 65–68.
5. Медведев И.Н., Завалишина С.Ю., Краснова Е.Г., Кутафина Н.В. Методические подходы к оценке агрегации

и поверхностных свойств тромбоцитов и эритроцитов // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10 (часть 1). – С. 117–120.

6. Медведев И.Н., Лапшина Е.В., Завалишина С.Ю. Активность тромбоцитарного гемостаза у детей с искривлениями позвоночника // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – № 5. – С. 579–580.

7. Медведев И.Н., Скорятин И.А. Влияние ловастатина на адгезивно-агрегационную функцию тромбоцитов у больных артериальной гипертензией с дислипидемией // Клиническая медицина. – 2010. – № 2. – С. 38–40.

8. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Оксид азота: роль в регуляции биологических функций, методы определения в крови человека // Лабораторная медицина. – 2005. – № 7. – С. 19–24.

9. Решетняк М.В., Хирмаков В.Н., Зыбина Н.Н., Фролова М.В., Сакута Г.А., Кудрявцев Б.Н. Модель метаболического синдрома, вызванного кормлением фруктозой: патологические взаимосвязи обменных нарушений // Медицинский академический журнал. – 2011. – Т.11, № 3. – С. 23–27.

10. Симоненко В.Б., Медведев И.Н., Мезенцева Н.И., Толмачев В.В. Антиагрегационная активность сосудистой стенки у больных артериальной гипертензией при метаболическом синдроме // Клиническая медицина. – 2007. – № 7. – С. 28–30.

11. Симоненко В.Б., Медведев И.Н., Носова Т.Ю. Агрегационная функция тромбоцитов у лиц с артериальной гипертензией с абдоминальным ожирением // Клиническая медицина. – 2008. – № 5. – С. 22–24.

12. Симоненко В.Б., Медведев И.Н., Гамolina О.В. Активность первичного гемостаза у больных артериальной гипертензией с нарушением толерантности к глюкозе на фоне применения трандолаприла // Клиническая медицина. – 2011. – № 2. – С. 29–31.

13. Симоненко В.Б., Медведев И.Н., Толмачев В.В. Динамика активности первичного гемостаза у больных артериальной гипертензией при метаболическом синдроме на фоне лечения кандесартаном // Клиническая медицина. – 2011. – № 3. – С. 35–38.

14. Симоненко В.Б., Медведев И.Н., Брюховецкий А.Г. Артериальная гипертензия и сосудистые дисфункции. – М.: изд-во «Эко-Пресс», 2012. – 288 с.

15. Medvedev I.N., Zavalishina S.Yu., Krasnova E.G., Belova T.A., Kutafina N.V. Meccanismi di base vascolare-piastrine emostasi // Italian Science Review. – 2014. – Vol. 3(12). – P. 167–169.

References

1. Volchegorskij I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.L., Celjlikman V.Je. Jeksperimental'noe modelirovanie i laboratornaja ocenka adaptivnyh reakcij organizma [Experimental modeling and laboratory evaluation of adaptive reactions of the organism]. Chelyabinsk; 2000. 167 p.

2. Kutafina N.V., Zavalishina S.Ju. Mehanizmy funkcionirovaniya sosudisto-trombocitarnogo gemostaza [Mechanisms of vascular-platelet hemostasis] // Bulletin of People's Friendship University, a series of «Ecology and life safety». 2012. no. 1. pp. 30–37.

3. Medvedev I.N., Gromnackij N.I. Vozdejstvie nebivolola na agregaciju trombocitov bol'nyh arterial'noj gipertoniej s metabolicheskim sindromom [Impact of nebivolol on platelet aggregation hypertensive patients with metabolic syndrome] // Clinical meditsina. 2005. Vol. 83, no. 3. pp. 31–33.

4. Medvedev I.N., Gromnackij N.I. Vozmozhnosti normodipina v korrekcii reologicheskikh svojstv trombocitov u bol'nyh arterial'noj gipertoniej s metabolicheskim sindromom [Opportunities normodipin correction of rheological properties of platelets in patients with arterial hypertension and metabolic syndrome] // Therapeutic arhiv. 2005. Vol.77, no. 6. pp. 65–68.

5. Medvedev I.N., Zavalishina S.Ju., Krasnova E.G., Kutafina N.V. Metodicheskie podhody k ocenke agregacii i

poverhnostnyh svojstv trombocitov i jeritrocitov [Methodological approaches to assessing aggregation and surface properties of platelets and red blood cells] // Fundamental issledovaniya. 2014. no. 10 (Part 1). pp. 117–120.

6. Medvedev I.N., Lapshina E.V., Zavalishina S.Ju. Aktivnost' trombocitarnogo gemostaza u detej s iskrivlenijami pozvonochnika [Activity platelet hemostasis in children with spinal curvature] // Bulletin eksperimentalnoy biology and meditsiny. 2010. no. 5. pp. 579–580.

7. Medvedev I.N., Skorjatina I.A. Vlijanie lovastatina na adgezivno-agregacionnuju funkciju trombocitov u bol'nyh arterial'noj gipertoniej s dislipidemiej [Effect of lovastatin on adhesively-aggregation platelet function in patients with arterial hypertension and dyslipidemia] // Clinical meditsina. 2010. no. 2. pp. 38–40.

8. Metel'skaja V.A., Gumanova N.G. Oksid azota: rol' v reguljacii biologicheskikh funkcij, metody opredelenija v krvi cheloveka [Nitric oxide: role in the regulation of biological functions, methods for determining a person's blood] // Laboratory meditsina. 2005. no. 7. pp. 19–24.

9. Reshetnjak M.V., Hirmakov V.N., Zybyina N.N., Frolova M.V., Sakuta G.A., Kudrjavcev B.N. Model' metabolicheskogo sindroma, vyzvannogo kormleniem fruktozoy: patologicheskie vzaimosvjazi obmennyh narushenij [Model of metabolic syndrome, caused by feeding fructose: pathologic correlation of metabolic disorders] // Academic Medical zhurnal. 2011. Vol.11, no. 3. pp. 23–27.

10. Simonenko V.B., Medvedev I.N., Mezenceva N.I., Tolmachev V.V. Antiagregacionnaja aktivnost' sosudistoj stenki u bol'nyh arterial'noj gipertoniej pri metabolicheskom sindrome [Antiplatelet activity of the vascular wall in hypertensive patients with metabolic syndrome] // Clinical meditsina. 2007.no. 7. pp. 28–30.

11. Simonenko V.B., Medvedev I.N., Nosova T.Ju. Agregacionnaja funkciya trombocitov u lic s arterial'noj gipertoniej s abdominal'nyim ozhireniem [Aggregation platelet function in patients with arterial hypertension and abdominal obesity] // Clinical meditsina. 2008. no. 5. pp. 22–24.

12. Simonenko V.B., Medvedev I.N., Gamolina O.V. Aktivnost' pervichnogo gemostaza u bol'nyh arterial'noj gipertoniej s narusheniem tolerantnosti k gljukeze na fone primeneniya trandolaprila [Activity of primary hemostasis in hypertensive patients with impaired glucose tolerance during treatment with trandolapril] // Clinical Medicine. 2011. no. 2. pp. 29–31.

13. Simonenko V.B., Medvedev I.N., Tolmachev V.V. Dinamika aktivnosti pervichnogo gemostaza u bol'nyh arterial'noj gipertoniej pri metabolicheskom sindrome na fone lechenija kandesartanom [Dynamics of activity of primary hemostasis in patients with arterial hypertension and metabolic syndrome during treatment with candesartan] // Clinical meditsina. 2011. no. 3. pp. 35–38.

14. Simonenko V.B., Medvedev I.N., Brjuhoveckij A.G. Arterial'naja gipertonija i sosudistye disfunkcii [Arterial hypertension and vascular dysfunction]. Moscow: Publishing House «Eco-Press», 2012. 288 p.

15. Medvedev I.N., Zavalishina S.Yu., Krasnova E.G., Belova T.A., Kutafina N.V. Meccanismi di base vascolare-piastrine emostasi // Italian Science Review. 2014. Vol. 3(12). pp. 167–169.

Рецензенты:

Жукова Л.А., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой эндокринологии, Курский государственный медицинский университет, г. Курск;

Громнацкий Н.И., д.м.н., профессор кафедры внутренних болезней № 2, Курский государственный медицинский университет, г. Курск.

Работа поступила в редакцию 24.02.2015.