

УДК 616.153.915:611.018.74:616.13-004.6

РАЗВИТИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРЛИПИДЕМИИ*Е.П. Турмова¹, П.А. Лукьянов², А.А. Григорюк¹, Е.А. Бычков¹, А.В. Цыбульский³*¹ Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),² Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159),³ Дальневосточный федеральный университет (690091 г. Владивосток, ул. Суханова, 8)*Ключевые слова: гиперлипидемия, цитокины, эндотелиальная дисфункция, эксперимент.*

Оценивались содержание некоторых цитокинов, НАДФ-диафоразы и показатели общей оксидантной и антиоксидантной активности в стенках аорты и бедренных артерий у крыс линии Вистар при экспериментальной гиперлипидемии. Зарегистрированы снижение уровня НАДФ-диафоразы в эндотелии. И в эксперименте, и в интактном контроле уровень интерлейкина-4 в аорте оказался значительно ниже, чем в бедренной артерии. При гиперлипидемии в бедренных артериях отмечалось снижение содержания интерлейкина-4, а в стенке аорты – увеличение уровней интерлейкина-4 и γ -интерферона и уменьшение оксидантной и антиоксидантной активности с низким оксидантным индексом. Установлено стимулирующее влияние интерлейкина-4 и ингибирующее действие γ -интерферона на общую оксидантную и антиоксидантную активность в стенке аорты.

С современных позиций ключевым звеном в патогенезе атеросклероза считается эндотелиальная дисфункция с дисбалансом между основными функциями эндотелия: вазодилатацией и вазоконстрикцией, ингибированием и содействием пролиферации, антитромботической и протромботической, антиокислительной и проокислительной активностью [1, 4, 5, 11, 14]. Показано, что при атеросклерозе наблюдается интенсификация процессов перекисного окисления липидов и снижение уровня антиоксидантной защиты [2, 4, 7].

Повреждение эндотелия сопровождается активацией (праймаингом) полиморфно-ядерных лейкоцитов (нейтрофилов), усилением секреции ими активных форм кислорода (синглетного кислорода и перекиси водорода) и интенсификацией перекисного окисления белков и жирных кислот [7]. Оксид азота – сигнальная молекула, которая осуществляет межклеточные взаимодействия и регулирует перекисное окисление липидов. В физиологических условиях оксид азота выступает в роли антиоксиданта, тормозит радикальные окислительные реакции, связываясь со свободными ионами двухвалентного железа, входящими в состав гема. При гиперпродукции активных форм кислорода происходит окисление липопротеидов, что способствует повышению синтеза кавеолина-1 и приводит к снижению образования оксида азота эндотелием [4, 7]. При активации свободнорадикальной активности происходит реакция супероксид-аниона с оксидом азота и образуется пероксинитрит, который служит пусковым фактором в развитии воспаления и повреждения тканей, по токсичности значительно превосходит оксид азота и лишает его биологического действия как фактора релаксации [4]. Пероксинитрит стимулирует

апоптоз и некроз клеток эндотелия и повышает их чувствительность к другим повреждающим факторам. Свое действие пероксинитрит реализует за счет инициации перекисного окисления липидов в мембранах и липопротеинах [2, 4]. Синтез оксида азота в организме катализируется семейством нитроксид-синтаз. Последние используют L-аргинин в качестве субстрата и никотинамидадениндинуклеотидфосфат-диафору (НАДФ-диафору) в качестве кофактора. НАДФ-диафору участвует в транспортировке электронов к простетической группе энзима [9].

Выработка цитокинов эндотелиальными клетками, лимфоцитами и клетками моноцитарно-макрофагального звена, участвующими в воспалительном процессе в артериальной стенке при ее повреждении, является ведущим патофизиологическим механизмом эндотелиальной дисфункции [6, 8, 11, 12]. При этом значительная роль в патогенезе атеросклероза отводится γ -интерферону (ИФН- γ). Этот цитокин служит локальным кофактором в направлении дифференцировки «наивных» Т-хелперов в Т-хелперы 1-го типа [6, 8], является сильным активатором макрофагов, их деструктивных функций в отношении артериальной стенки (выделение кислородных радикалов, оксида азота, гидролитических ферментов) по типу реакции гиперчувствительности замедленного типа с формированием гранулематозного воспалительного очага [6]. Кроме этого ИФН- γ активирует натуральные киллеры, индуцирует экспрессию на макрофагах и гладкомышечных клетках белков главного комплекса гистосовместимости I и II классов и липопротеиновых рецепторов на гладкомышечных клетках, а также способствует снижению экспрессии липопротеиновых рецепторов на макрофагах [6, 8]. Показано, что ИФН- γ индуцирует образование VCAM-1 эндотелием артериальной стенки. Известно, что при добавлении к нагруженному холестерином макрофагам ИФН- γ способен существенно влиять на соотношение холестерина и его эфиров в сторону накопления последних, тормозить захват и удаление холестерина из клеток с помощью липопротеинов высокой плотности, что приводит к трансформации макрофагов в пенные клетки [6, 8].

Противоречивая роль отводится и интерлейкину-4 (ИЛ)-4, который обладает как антиатерогенными, так и проатерогенными свойствами. Известно, что ИЛ-4 способствует Т-хелперному ответу 2-го типа (частично за счет аутокринной активации), приводит в действие иммуносупрессивные системы, направленные

на макрофаги, включая подавление продукции провоспалительных цитокинов и стимулируя выработку рецепторного антагониста ИЛ-1. ИЛ-4 способствует переключению иммунной системы с клеточного на гуморальный ответ [3, 6, 8, 13]. ИЛ-4 подавляет пролиферацию гладкомышечных клеток и адгезивность макрофагов, влияет на индуцированную модифицированными липопротеинами низкой плотности аккумуляцию холестерина в макрофагах. При этом показано, что у мышей с дефицитом ИЛ-4 отмечается низкая чувствительность к атерогенной диете, у них обнаружена относительная устойчивость к прогрессированию жировой полоски под влиянием белка теплового шока микобактерий туберкулеза [6]. К проатерогенным эффектам ИЛ-4 относятся индукция им экспрессии Р-селектина и 15-липооксигеназы эндотелиальными клетками, экспрессии VCAM-1 и металлопротеиназы 1-го типа гладкомышечными клетками, а также усиление экспрессии рецепторов мембранных белков и этерификации холестерина в макрофагах [6, 8, 10]. Этот цитокин обнаруживается в атеросклеротически поврежденных артериях человека и мышей, нокаутированных по апопротеину E [3, 6].

Однако взаимосвязь цитокинов с нарушениями оксидантного статуса артериальной стенки остается до конца не выясненной и требует дальнейшего изучения.

Цель исследования: оценить оксидантный статус, содержание НАДФ-диафоразы артерий и уровень цитокинов (ИЛ-4 и ИФН- γ) при длительной экспериментальной гиперлипидемии у крыс.

Материал и методы. Для индукции гиперлипидемии у 15 крыс линии Вистар, массой 200–250 г (1-я группа), использовали метод К.А. Мещерской и Н.П. Королевой в модификации с добавлением в корм холестерина, мерказолила и витамина D в течение 6 месяцев (180 суток) [5]. Эксперимент проводился со строгим соблюдением требований Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента и последующей утилизации. В постановке опытов руководствовались требованиями Всемирного общества защиты животных и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных. Исследование одобрено междисциплинарным этическим комитетом (протокол № 4, дело № 21 от 24.01.2011 г.). Контролем в ходе эксперимента служили 15 здоровых крыс, находившихся на обычном рационе (2-я группа). Через 6 месяцев животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом путем декапитации. Проводили забор фрагментов аорты и бедренных артерий.

Определение общей оксидантной и антиоксидантной активности проводили спектрофотометрическим методом, разработанным в лаборатории химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН с использованием индикатора – пигмента морского ежа *Scaphechinus mirabilis* – гистохрома [4]. Оксидантную и антиоксидантную активность оценивали по

показателю коэффициента оптической плотности, вычисляемого по формулам:

$$OOA=(E_1-E_2):K,$$

где OOA – общая оксидантная активность, E_1 и E_2 – экстинкции проб при первом и втором измерении, $K=0,27$ (при этом поглощение контрольной пробы при первом измерении – 0,427);

$$AOA=(E_o-E_{\min}):(E_{\max}-E_{\min}),$$

где AOA – антиоксидантная активность, E_{\max} , E_{\min} , E_o (E_2-E_1) – экстинкции соответственно контрольной и опытной проб.

Для суждения о дисбалансе антиоксидантной и оксидантной систем определялся оксидантный индекс по формуле: OOA/AOA.

Определение концентрации цитокинов в надосадке биоптатов артерий проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов Rat ELISA Set BD OptEIA™ (BD Biosciences, США).

Метод определения НАДФ-диафоразы основан на образовании диформаза в присутствии эндогенного β -НАДФ и солей тетразолия. НАДФ-диафораза осуществляет перенос протонов от НАДФ к нитросинему тетразолию. Восстановленный нитросиний тетразолий превращается в нерастворимый продукт – диформазан, его расположение указывает на локализацию активности нитроксидсинтазы.

Фрагменты сосудов фиксировали в холодном 4 % растворе параформальдегида, приготовленном на 0,1М фосфатном буфере (рН 7,2) в течение 4 часов. Затем промывали 0,1М фосфатным буфером (рН 7,2) в течение 6 часов и помещали в раствор 20 % сахарозы на ночь. Серийные срезы толщиной 50 мкм (для гистохимической реакции на НАДФ-диафорузу) изготавливали во фронтальной плоскости на замораживающем микротоме. Срезы в планшетах помещали в инкубационную среду и термостатировали 1 час при 37 °С. Состав инкубационной среды был следующим: 50 мМ Трис-буфер, 0,2 % Тритон X-100, 0,8 мг/мл НАДФ, 0,4 мг/мл НСТ; рН 8,0. После инкубации срезы трехкратно промывали в дистиллированной воде, помещали на предметные стекла, обезвоживали в спиртах и заключали в балзам. Интенсивность окрашивания эндотелия соответствовала активности энзима и позволяла выделить три группы НАДФ-диафоразопозитивных клеток с высокой, умеренной и низкой активностью фермента. Активность фермента определяли при помощи программы ImageJ 1.37 и выражали в единицах оптической плотности.

Для математической обработки полученных данных использовали программу SPSS 16. Сравнение средних значений в выборках осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции по Спирмену.

Результаты исследования. В аорте 1-й группы крыс показатели общей оксидантной и антиоксидантной активности были ниже, чем у контрольных животных.

Таблица 1

Показатели общей оксидантной и антиоксидантной активности артерий крыс

Группа	Общая оксидантная активность				Антиоксидантная активность				Оксидантный индекс			
	аорта		бедренная артерия		аорта		бедренная артерия		аорта		бедренная артерия	
	Me ¹	0,25–0,75 ²	Me ¹	0,25–0,75 ²	Me ¹	0,25–0,75 ²	Me ¹	0,25–0,75 ²	Me ¹	0,25–0,75 ²	Me ¹	0,25–0,75 ²
1-я	0,28 ^{3,4}	0,21–0,32	0,53	0,48–0,55	0,33 ^{3,4}	0,31–0,35	0,47	0,42–0,53	0,84 ^{3,4}	0,82–0,87	1,13	1,10–1,18
2-я	0,69	0,62–0,73	0,61	0,58–0,64	0,51	0,46–0,54	0,46	0,44–0,55	1,35	1,31–1,40	1,32	1,18–1,41

¹ Здесь и в табл. 2: медиана.² Здесь и в табл. 2: интерквартильный размах.³ Разница со 2-й группой статистически значима.⁴ Разница с бедренной артерией статистически значима.

Таблица 2

Уровень цитокинов в артериях крыс при экспериментальной гиперлипидемии

Группа	ИЛ-4, пг/мл				ИФН-γ, пг/мл			
	аорта		бедренная артерия		аорта		бедренная артерия	
	Me	0,25–0,75	Me	0,25–0,75	Me	0,25–0,75	Me	0,25–0,75
1-я	17,4 ^{1,2}	16,4–21,9	44,5 ¹	30,1–44,5	3,9 ¹	3,6–4,7	3,6	3,1–4,2
2-я	10,2 ²	7,9–11,1	63,9	59,4–64,1	3,0	2,2–3,3	3,4	2,8–4,0

¹ Разница со 2-й группой статистически значима.² Разница с бедренной артерией статистически значима.

Таблица 3

Корреляционные связи (r) между содержанием цитокинов и показателями оксидативной активности в аорте крыс

Группа	ИЛ-4 ОАА ¹	ИЛ-4 ОИ ²	ИЛ-4 АОА ³	ИФН-γ ОАА ¹	ИФН-γ ОИ ²	ИФН-γ АОА ³
1-я	0,62	0,64	0,57	-0,46	-0,48	-0,38
2-я	-0,56	-0,56	-0,54	0,32	0,36	0,72

¹ Общая оксидантная активность.² Оксидантный индекс.³ Антиоксидантная активность.

Во фрагментах бедренных артерий эти показатели не имели достоверных различий с контролем. В сосудах животных опытной группы оксидантный индекс был ниже, чем в контроле, при этом в аорте крыс с гиперлипидемией он был ниже, чем в бедренных артериях (табл. 1).

Анализ цитокинов в сосудах крыс показал достоверные различия в содержании ИЛ-4 в зависимости от их морфологии (аорта – сосуд эластического типа, бедренная артерия – сосуд мышечного типа): уровень этого цитокина в аорте крыс обеих групп был значительно ниже, чем в бедренных артериях. В аорте животных с моделью гиперлипидемии значения ИЛ-4 были выше, чем в аорте контрольных животных (табл.2), что отражало активацию гуморальных механизмов локального иммунного реагирования и соответствовало данными литературы. Известно, что на ранних стадиях атеросклероза у апоЕ-нокаутированных мышей в результате активации Т-хелперного ответа 1-го типа образуются иммуноглобулин-G-антитела к окисленным липопротеидам низкой плотности, тогда как на поздних стадиях атеросклероза происходит экспрессия иммуноглобулинов класса G, характерных для Т-хелперного ответа 2-го типа с участием ИЛ-4 [3].

Во фрагментах бедренных артерий опытных крыс, напротив, регистрировалось снижение уровня ИЛ-4. Противоположная картина наблюдалась в отношении ИФН-γ: отмечалось увеличение его уровня в аорте крыс 1-й группы, тогда как в бедренных артериях контрольных животных содержание цитокина не изменилось, что, вероятно, характеризовало преимущественное повреждение аорты в модели гиперлипидемии на протяжении 6 месяцев исследования (табл. 2). Однако при

этом было отмечено значительное увеличение медианы индекса ИЛ-4/ИФН-γ в аорте 1-й группы крыс по сравнению с контрольной группой: 4,46 (4,39–4,65) против 3,5 (3,5–3,36) соответственно – и снижение этого индекса в бедренных артериях: 10,0 (9,70–10,5) против 18,7 (16,0–21,2) соответственно. Это характеризовало повреждение бедренных артерий как опосредованное активацией клеточных иммунных механизмов.

Обсуждение полученных данных. Патогенетическая роль ИФН-γ в атерогенезе подтверждается данными литературы. У апоЕ-нокаутированных мышей с перекрестным нокаутом рецептора ИФН-γ наблюдается снижение размера повреждения артерий, липидных включений и клеточной активности. После того как апоЕ-нокаутированным мышам вводили рекомбинантный ген ИФН-γ на протяжении 30 дней, у них увеличивался размер атеросклеротического повреждения восходящей аорты [6]. Известно, что добавление к макрофагам рекомбинантного ИФН-γ существенно ингибирует деградацию ацетилированных липопротеинов низкой плотности, уменьшает количество связывающих сайтов на клеточной мембране, снижает скорость интернализации и транспортировки липопротеинов в лизосомы без изменения их деградации в самих лизосомах [6].

Нами выявлены прямые корреляционные связи между ИЛ-4 и показателями оксидации в аорте опытных крыс, тогда как в группе здоровых животных корреляционные связи между данными показателями были обратные. В отношении ИФН-γ определены противоположные результаты (табл. 3).

Зарегистрировано снижение содержания НАДФ-диафоразы в аорте и бедренных артериях у крыс с гиперлипидемией: медиана уровня этого фермента в аорте – 27

(24–31) против 60 (58–61) в контроле, в бедренных артериях – 11 (11–13) против 29 (25–32) в контроле. При этом в бедренных артериях содержание НАДФ-диафоразы было достоверно ниже, чем в аорте, как в 1-й так и во 2-й группах животных, что, вероятно, можно объяснить анатомическими особенностями данных сосудов.

В 1-й группе установлена прямая корреляционная связь ($r=0,74$) между антиоксидантной активностью и уровнем НАДФ-диафоразы в аорте. Выявлена обратная корреляционная связь ($r=-0,64$) между уровнями ИФН- γ и НАДФ-диафоразы в бедренных артериях крыс с гиперлипидемией.

Таким образом, при длительной экспериментальной гиперлипидемии у крыс наблюдается низкий уровень оксидантной и антиоксидантной активности в аорте. Наличие прямой корреляционной связи между показателями антиоксидантной активности и уровнем НАДФ-диафоразы в аорте подтверждает, что длительная гиперлипидемия вызывает угнетение функции эндотелия и, возможно, способствует апоптотической гибели эндотелиоцитов, приводя к снижению активности их антиоксидантных ферментов и ферментов семейства нитроксидсинтаз.

Установлены изменения локальной продукции цитокинов в зависимости от структурных особенностей артерий, что отражает функциональную специфику реагирования эндотелия определенных сосудов на патогенные влияния. В бедренных артериях к 6-му месяцу эксперимента определено снижение концентрации ИЛ-4, при неизменном уровне ИФН- γ , тогда как только в аорте крыс зарегистрировано увеличение концентрации и ИЛ-4, и ИФН- γ , что, вероятно, свидетельствует о преимущественном цитокиноопосредованном повреждении именно данного сосуда в результате длительной гиперхолестеринемии. Увеличение соотношения ИЛ-4/ИФН- γ в аорте крыс 1-й группы свидетельствует о локальной активации гуморальных механизмов иммунного реагирования и их угнетающем влиянии на клеточный иммунный ответ, опосредованный ИФН- γ , или о повышении рецепторного связывания ИФН- γ и/или его инактивации.

В условиях длительной гиперлипидемии наблюдается противоположное влияние цитокинов на показатели оксидации в аорте крыс – стимулирующее влияние ИЛ-4 как на про-, так и на антиоксидантную активность, и отрицательное влияние ИФН- γ на данные показатели. Отмечено ингибирующее влияние ИФН- γ на активность НАДФ-диафоразы в эндотелии бедренных артерий опытной группы крыс. Выявленная специфика требует дальнейшего изучения содержания цитокинов и системы оксидантной и антиоксидантной активности сосудов с учетом морфологических и функциональных параметров артериальной стенки.

References

1. Vorobeva E.N., Shumaker G.I., Osipova I.V. et al. The role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis, *Kardiologičeskaja terapija i profilaktika*. 2006, No. 5 (6). P. 129–136.
2. Zotova I.V., Zatejwiko D.A., Sidorenko B.A. Synthesis of nitric oxide and the development of atherosclerosis, *Kardiologičeskaja*. 2002, No. 4. P. 57–67.

3. Kozlov V.A., Dushkin M.I., Verewagin E.I. Vaccine against atherosclerosis: Facts and Perspectives, *Citokiny i vospalenie*. 2008, No. 1. P. 8–13.
4. Lupach N.M., Hludceva E.A., Lukjanov P.A. et al. Matrix metalloproteinases, oxidative status and endothelial dysfunction with hiperholestrinemy in patients with various forms of ischemic heart disease, *Rossijskij medicinskij zhurnal*. 2010, No. 4. P. 71–74.
5. Mewerskaja K.A., Borodina G.P., Koroleva N.P. About the method of agents selection, affecting on the cholesterol metabolism, *Jeleuterokokk i drugie adaptogeny iz dalnevostochnyh rastenij* / ed. K.A. Mewerskoj. Vladivostok, 1966. P. 289–294.
6. Cytokine system: theoretical and clinical aspects / ed. V.A. Kozlova, S.V. Sennikova. Novosibirsk: Nauka, 2004. 324 p.
7. Titov V.N. The generality of atherosclerosis and inflammation: the specificity of atherosclerosis as an inflammatory process (hypothesis), *Kliničeskaja laboratornaja diagnostika*. 2006, No. 4. P. 310.
8. Haitov R.M. Immunology. Normal and pathological conditions: a textbook. M.: Medicina, 2010. 752 p.
9. Shumatova T.A., Prihodchenko N.G., Grigorjan L.A. et al. Nitroindergic mechanisms in the pathogenesis of persistent diarrhea in infants in the first year, *Pacific Medical Journal*. 2010, No. 3. P. 59–61.
10. Shljahto E.V., Gavrishcheva N.A., Ovchinnikova O.A. et al. The effect of inflammation induction on the metabolism of collagen in atherosclerotic plaques in mouse, *Medicinskaja immunologija*. 2008, No. 6. P. 507–512.
11. Allison B.R., Amy D.G. Atherosclerosis: immune and inflammatory aspects, *Journal of investigative medicine*. 2006, Vol. 54, No. 3. P.123–131.
12. Huber S.A., Sakkinen P., David C. T-helper-cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia, *Circulation*. 2001, No. 103. P. 2610–2616.
13. Georg J., Shoenfeld Y. Requisite role for interleukin-4 in the acceleration of fatty streaks induced by heat shock protein 65 of Mycobacterium tuberculosis, *Circ. Res. J*. 2000, No. 86. P. 1203–1210.
14. Park I.K., Son H., Kim S.W., Paick J.-S. Initial validation of a novel rat model of vasculogenic erectile dysfunction with generalized atherosclerosis International, *Journal of Impotence Research*. 2005, Vol.17. P. 424–430.

Поступила в редакцию 15.04.2011.

PROGRESSION OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION DURING EXPERIMENTAL HYPERLIPIDEMIA

E.P. Turmova¹, P.A. Lukyanov², A.A. Grigoryuk¹, E.A. Byihkov¹, A.V. Tsyul'skiy³

¹Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russian Federation), ²Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (159 100 Year Anni-versary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russian Federation), ³Far Eastern Federal University (8 Suhanova St. Vladivostok 690091 Russian Federation)

Summary – The authors evaluated the content of some cytokines, NADPH-diaphorase and the indices of oxidative and anti-oxidative activity in walls of aorta and femoral arteries of wistar rats during experimental hyperlipidemia. The levels of NADPH-diaphorase in endothelium decreased. Both during the experiment and intact control, the level of interleukin-4 in aorta was significantly lower than that in femoral artery. With the hyperlipidemia in femoral arteries, the authors have registered a decrease of interleukin-4, but an increase of interleukin-4 and γ -interferon and decrease of oxidative and anti-oxidative activity with low oxidative index in the aorta wall. The authors prove a stimulating effect of interleukin-4 and inhibitory action of γ -interferon upon general oxidative and anti-oxidative activity in the wall of aorta.

Key words: hyperlipidemia, cytokines, endothelial dysfunction, experiment.