

КОРРЕКЦИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ L-NAME-ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В ТЕЧЕНИЕ 28 ДНЕЙ СВЕРХМАЛЫМИ ДОЗАМИ АНТИТЕЛ К eNOS И К VEGF

А.С. БЕЛОУС

*Курский государственный
медицинский университет*

e-mail: a.s.belous@mail.ru

Моделирование L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота (внутрибрюшинным введением L-NAME в дозе 12,5 мг/кг в течение 28 дней) у крыс приводило к развитию гипертрофии миокарда и мышечного слоя сосудистой стенки, ишемии почек с типичными для данного состояния изменениями. В условиях этой модели обнаружен протективный эффект сверхмалых доз поликлональных кроличьих антител к eNOS и сверхмалых доз антител к фактору роста эндотелия сосудов VEGF, выражающийся в предотвращении увеличения поперечного диаметра миокардиоцитов и более благоприятной картине морфологических изменений в почках.

Ключевые слова: eNOS, VEGF, эндотелий, оксид азота, L-Name.

Эндотелиальные клетки сосудов осуществляют синтез локально действующих медиаторов и морфофункционально ориентированы на оптимальное регулирование органного кровотока [3, 4]. Оксид азота II (NO), вырабатываемый эндотелиоцитами, как мощный эндогенный гуморальный вазодилататор, участвует в релаксации сосудов, является аутокринным и паракринным медиатором [2].

Эндотелиальная дисфункция — это дисбаланс между сосудорасширяющими и сосудосуживающими медиаторами, который, как правило, характеризуется уменьшением выработки вазодилататоров [6, 7].

Современные исследования доказали, что дисфункция эндотелия является обязательным компонентом патогенеза практически всех сердечно-сосудистых заболеваний, включая атеросклероз, гипертонию, ИБС и др. ИБС и артериальная гипертензия являются одними из основных факторов, повышающих инвалидизацию и смертность за счёт таких осложнений, как инфаркт миокарда, сердечная недостаточность и инсульт [1, 5].

Возможность неоваскуляризации ишемизированных тканей с помощью фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) доказана в многочисленных экспериментальных работах с помощью гистологических, ангиографических, радионуклидных методов на моделях ишемии миокарда и скелетных мышц у грызунов, собак, свиней и овец. Эти факторы роста использовали как в виде рекомбинантных белков, так и конструкций в плазмидном или аденовирусном векторе. Важной составляющей механизмов действия VEGF является активация эндотелиальной NO-синтазы.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния сверхмалых доз поликлональных кроличьих антител к eNOS и к фактору роста эндотелия сосудов VEGF на 28-дневной модели L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота на морфологические изменения сердечно-сосудистой системы в результате развития эндотелиальной дисфункции.

Методика исследования. В эксперименте были выделены следующие группы животных: 1) интактные самцы (вводили дистиллированную воду); 2) контрольная группа (моделирование дефицита оксида азота внутрибрюшинным введением L-NAME в дозе 12,5 мг/кг в течение 28 дней); 3) L-NAME + сверхмалые дозы антител к эндотелиальной NO-синтазе, внутривенно из расчёта 9 мл/кг/сут. (ежедневно в дозе 4,5 мл/кг 2 раза в сутки в течение 28 дней через 30 минут после введения L-NAME); 4) L-NAME + сверхмалые дозы антител к фактору роста эндотелия сосудов VEGF, внутривенно из расчёта 9 мл/кг/сут. (ежедневно в дозе 4,5 мл/кг 2 раза в сутки в течение 28 дней через 30 минут после введения L-NAME).

На 29-й день эксперимента под наркозом (хлоралгидрат 300 мг/кг) для морфологического исследования после выведения животных из эксперимента производили забор материала органов: сердца, почек, надпочечников, участков сонных артерий и брюшной аорты, участка мышцы голени. Материал фиксировали в 10% растворе формалина. После фиксации производили вырезку кусочков для гистологического исследования по следующим методикам. Сердца рассекали через середину во фронтальной плоскости через все отделы в виде пластин толщиной 2 мм, в которых содержались оба предсердия, правый и левый желудочки, межжелудочковая перегородка. Кусочки почек вырезали в поперечном направлении строго через центральную часть, включающую почечный сосочек. Материал фиксирован, вырезан и залит в парафин в одни сроки. Заливку в парафин осуществляли одновременно в автомате карусельного типа STP-120 (Microm Int. GmbH, Германия). Кусочки из одной серии эксперимента заливали в парафин в виде одного блока (по 4- 6 кусочков) на станции ЕС-350 (Microm Int. GmbH, Германия), что позволяло достигать максимальной стандартизации условий предварительной обработки и последующего изготовления гистологических срезов на полуавтоматическом микротоме с системой транспортировки срезов ЕС-340. Окраску срезов гематоксилином и эозином производили также в автоматическом режиме в автостейнере HMS 740 (Microm Int. GmbH, Германия). Для последующего анализа морфологических изменений и морфометрии микропрепараты сканировали на системе для архивирования и анализа изображений MiraxDesk (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия). Определяли диаметры кардиомиоцитов левого желудочка, кровеносных сосудов, в почках измеряли диаметры почечных клубочков. Просмотр, анализ и морфометрию осуществляли с помощью программы просмотра и анализа изображений Mirax Viewer 1.12.

Достоверность изменений абсолютных параметров определяли разностным методом вариационной статистики с нахождением средних значений сдвигов (M), средней арифметической ($\pm m$) и вероятности возможной ошибки (p) по таблицам Стьюдента. Различия оценивали как достоверные при $p < 0,05$. Статистические расчёты проводились с использованием программы Microsoft Excel 7.0.

Результаты исследования. При морфологическом исследовании сердца и почек обнаружен протективный эффект сверхмалых доз антител к VEGF и сверхмалых доз антител к эндотелиальной NO-синтазе (рис. 1, 2).

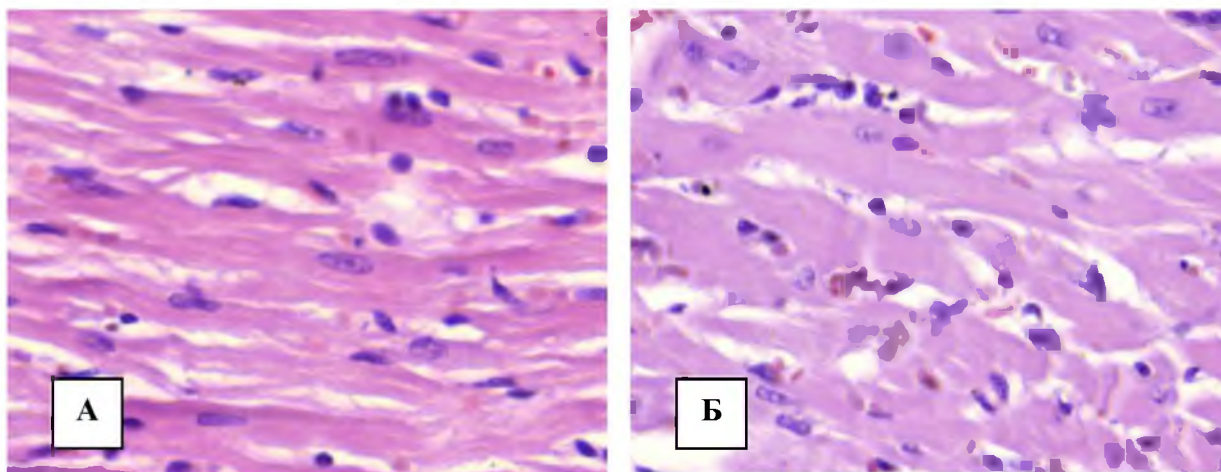


Рис. 1. Морфология миокарда у животных с коррекцией патологии.

А – гистологическая картина миокарда у крыс с коррекцией потенцированными антителами к VEGF на поперечном срезе; Б – гистологическая картина миокарда у крыс с коррекцией потенцированными антителами к eNOS на поперечном срезе.

Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото x400

В сердце контрольной группы (L-NAME-индуцированный дефицит NO) обнаружена гипертрофия кардиомиоцитов левого желудочка до $15,14 \pm 0,33$ мкм

(в норме $9,91 \pm 0,17$ мкм), сосудистые изменения в виде спастического состояния артериол, утолщения их стенок. При окраске гематоксилином Рого выявлялись очаговые сегментарные или тотальные повреждения кардиомиоцитов контрактурного типа.

Исследуемые гомеопатические разведения статистически достоверно предотвращали увеличение поперечного диаметра миокардиоцитов. В группе дополнительным введением сверхмалых доз антител к эндотелиальной NO-синтазе – диаметр кардиомиоцитов составил 10,5 мкм, в группе с дополнительным введением сверхмалых доз антител к фактору роста эндотелия сосудов VEGF – 9,39 мкм (рис. 2).

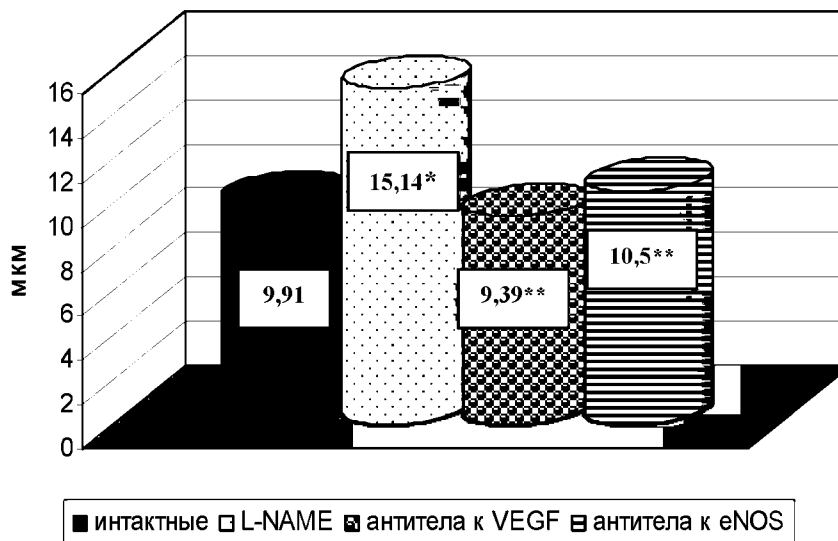


Рис. 2. Влияние сверхмалых доз антител к VEGF и сверхмалых доз антител к eNOS на диаметр кардиомиоцитов у животных с введением L-NAME (в мкм)
Примечание: ** – при $p < 0,05$ в сравнении с L-NAME, * – при $p < 0,05$ в сравнении с интактными

При микроскопии почек в контрольной группе выявлены типичные для данного состояния изменения. Наблюдались клиновидные участки некроза, атрофии паренхимы с коллапсом стромы, ее лимфоидной инфильтрацией. Выраженные диффузные изменения почечных телец в виде сморщивания, гиалиноза и склероза, гиалиноз и склероз артерий. Эпителий канальцев уплощен, на значительных участках десквамирован. Практически все канальцы заполнены плотными гиалиновыми цилиндрами. В группах животных с введением сверхмалых дозы антител к eNOS и к VEGF обнаруживалась более благоприятная картина морфологических изменений в почках.

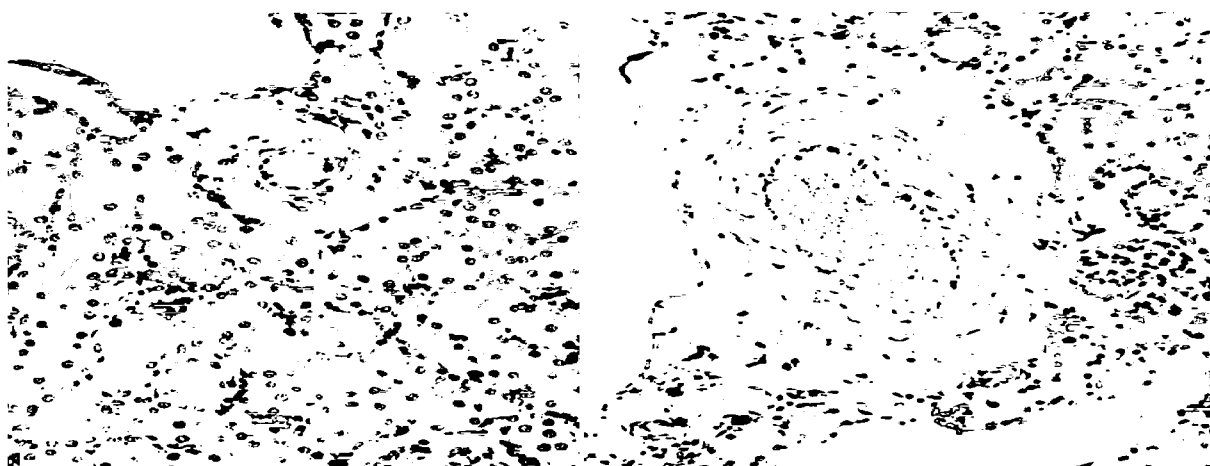


Рис. 3. Морфологическая картина крупных почечных артерий у животных с коррекцией потенцированными антителами к VEGF в дозе 9 мл/кг/сут. Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото $\times 400$

Клубочки и канальцевый эпителий нефронов патологических изменений не имели, в единичных случаях наблюдалось умеренное расширение канальцев, в просвете единичных канальцев имелись гиалиновые цилиндры. Соединительнотканная строма без воспалительных инфильтратов и рубцов. Эпителий лоханок был не изменен (рис. 3, 4).

Проведенные исследования обнаружили протективный эффект сверхмалых доз антител к eNOS и к фактору роста эндотелия сосудов VEGF, выражающийся в предотвращении увеличения поперечного диаметра миокардиоцитов и более благоприятной картине морфологических изменений в почках.

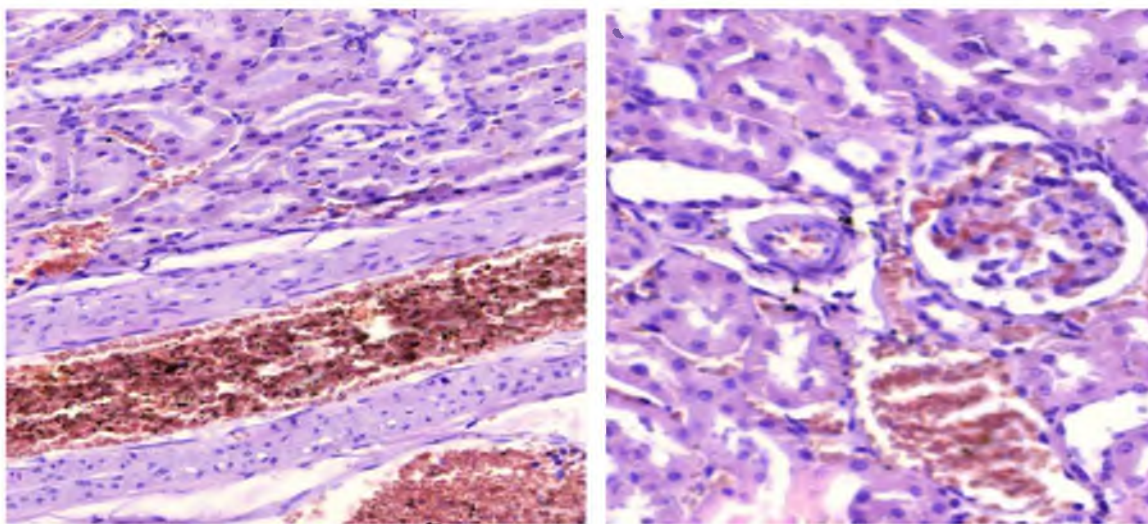


Рис. 4. Морфологическая картина крупных почечных артерий у животных с коррекцией потенцированными антителами к eNOS в дозе 9 мл/кг/сут. Окр. гематоксилином и эозином. Микрофото х400

Результаты проведенного исследования позволяют рекомендовать дальнейшее клиническое изучение сверхмалых доз антител к eNOS и к фактору роста эндотелия сосудов VEGF для коррекции эндотелиальной дисфункции. Перспективным является изучение данных растворов сверхмалых доз антител в комбинации с классическими антигипертензивными препаратами.

Литература

1. Бокарев, И.Н. Артериальная гипертензия – болезнь или фактор риска? / И.Н. Бокарев // *Клинич. медицина.* – 2004. – № 9. – С. 69-71.
2. Граник, В.Г. Экзогенные доноры оксида азота и ингибиторы его образования (химический аспект) / В.Г. Граник, С.Ю. Рябова, Н.Б. Григорьев // *Успехи химии.* – 1997. – Т. 66, № 8. – С. 792-807.
3. Дворецкий, Д.П. Механогенная регуляция тонуса и реактивности кровеносных сосудов / Д.П. Дворецкий // *Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова.* – 1999. – Т 85, № 9-10. – С. 1267-1277.
4. Затейщикова, А.А. Эндотелиальная регуляция сосудистого тонуса: методы исследования и клиническое значение / А.А. Затейщикова, Д.А. Затейщиков // *Кардиология.* – 1998. – Т. 38, № 9. – С. 68-80.
5. Минушкина, Л.О. Генетические аспекты регуляции эндотелиальной функции при гипертензии / Л.О. Минушкина, Д.А. Затейщиков, Б.А. Сидоренко // *Кардиология.* – 2000. – № 3. – С. 68-76.
6. Роль оксида азота и свободных радикалов в патогенезе артериальной гипертензии / Е.Б. Манухина, Н.П. Лямина, П.В. Долотовская и др. // *Кардиология.* – 2002. – Т. 42, № 11. – С. 73-84.
7. Luscher, T.F. Vascular protection: current possibilities and future perspectives / T.F. Luscher // *Int. J. Clin. Pract.* – 2001. – Vol. 117. – P. 3-6.



CORRECTION OF MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE SIMULATION L-NAME-INDUCED ENDOTHELIAL DYSFUNCTION WITHIN 28 DAYS OF ULTRA-SMALL DOSES OF ANTIBODIES TO ENOS AND VEGF

A.S. BELOUS

*Kursk State Medical
University*

e-mail: a.s.belous@mail.ru

Modelling of L-NAME – induced deficiency of nitric oxide (intraperitoneal administration of L-NAME at a dose of 12.5 mg / kg for 28 days) in rats led to the development of myocardial hypertrophy and the muscle layer of the vascular wall, renal ischemia with typical for this state change. In this model the protective effect of ultra-low doses of polyclonal rabbit antibodies to eNOS and ultra-low doses of antibodies to factor of endothelial growth of vascular VEGF which is expressed in the prevention of increase in transverse diameter of miokardiotsitov and a more favorable picture of the morphological changes in the kidneys. have been observed

Key words: eNOS, VEGF, the endothelium, nitric oxide, L-Name.