

Цыбиков Н.Н., Фефелова Е.В., Терешков П.П., Измestьев С.В.

## **Дисфункция эндотелия при экспериментальной гипергомоцистеинемии**

ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия», Россия, 672000, г.Чита, ул. Горького, д. 39 а

**Цель исследования** — изучение последствий дисфункции эндотелия, возникающих при экспериментальной гипергомоцистеинемии. **Методика.** Эксперимент выполнен на 42 белых беспородных крысах-самцах массой 150 г, одного возраста. Исследовано 2 группы животных по 21 в каждой. Гипергомоцистеинемии у опытных животных создавали путем внутрибрюшинного введения гомоцистеина в дозе 0,1 мкмоль на 1 г массы 1 раз в сут. в течение 14 сут. Крысам контрольной группы внутрибрюшинно вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. В сыворотке крови определяли концентрацию гомоцистеина методом ВЭЖХ, содержание IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17A с помощью системы мультиплексного анализа FlowCytomix 5 plex (BMS826FF) в комбинации с Simplex Kit (BMS8635FF) соответствующих аналитов для крыс (компания «Bender Medsystems», Австрия). Коагулогические показатели определяли в плазме крови, взятой из подключичной вены. Экспрессию тканевого фактора (TF) оценивали иммуногистохимическим методом. **Результаты.** У крыс с гипергомоцистеинемией регистрировали пятикратное увеличение уровня эндотелина, снижение концентрации нитратов и нитритов. В эндотелиоцитах сосудов миокарда выявлена экспрессия тканевого фактора, параллельно с этим, сокращение активированного частичного тромбопластинового и тромбинового времени, повышение содержания растворимого фибрин-мономерного комплекса, а также резкое увеличение концентрации фактора некроза опухолей и интерферона гамма. **Заключение.** Таким образом, экспериментальная ГГЦ сопровождается выраженной дисфункцией эндотелия, что проявляется в повышении тромбогенных свойств крови, повышением уровня эндотелина и цитокинов.

**Ключевые слова:** гомоцистеин, эндотелий, тканевой фактор, коагулограмма, цитокины

**Для корреспонденции:** Фефелова Елена Викторовна, канд. мед. наук, доцент каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО ЧГМА, e-mail: fefelova.elena@mail.ru

**Для цитирования:** Цыбиков Н.Н., Фефелова Е.В., Терешков П.П., Измestьев С.В. Дисфункция эндотелия при экспериментальной гипергомоцистеинемии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(3): 42–46.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 26.02.2015

Tsybikov N.N., Fefelova E.V., Tereshkov P.P., Izmestiyev S.V.

## **Endothelial dysfunction in experimental hyperhomocysteinemia**

Chita State Medical Academy, Chita, Russia, Gorkogo str. 39a, Chita, Russia, 672000

**The purpose:** to investigate the consequences of the endothelium dysfunction caused by the experimental hyperhomocysteinemia.

**Methods.** The experiment included the similar aged 42 white non-pedigree male rats with average weight of 150 grams. The rats were divided in two groups each of these having 21 species. Hyperhomocysteinemia was induced in experimental rats by intraperitoneal injection of 0,1  $\mu$ mol homocysteine per 1 gr of weight once a day during 14 days. The equal intraperitoneal dose of the physiological solution was injected to the rats of the control group. The level of homocysteine was determined in the blood serum with high-yield liquid chromatography (HYLC), the content of IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17A c was measured with the system of multiplex analysis FlowCytomix 5 plex (BMS826FF) combined with Simplex Kit (BMS8635FF) of appropriate analyts for «Bender Medsystems» rats (Austria). Coagulation indices were determined in the blood plasm of subclavian vein. TF expression of tissue factor was estimated with immune histochemical method. **Results.** Fivefold increase of endothelin level and decrease of nitrates and nitrites levels were found in rats with hyperhomocysteinemia. Expression of tissue factor, shortening of activated partial thromboplastin and thrombin times, increase of soluble fibrin monomeric complex level, significant increase of tumor necrosis factor and interferon gamma levels were identified in endothelial cells of myocardial vessels. **Conclusion.** Thus, experimental hyperhomocysteinemia (HHC)

proved to be accompanied by expressed endothelium dysfunction which is marked by thrombogenic activity of blood as well as endothelium and cytokine level increasing.

**Keywords:** homocysteine, endothelium, tissue factor, coagulogram, cytokines

**For correspondence:** Fefelova Elena, Department of Pathological physiology, Chita state medical academy of Russia, 672000, Russia, Chita, ul. Gorky 39a; e-mail: fefelova.elena@mail.ru

**For citation:** Tsybikov N.N., Fefelova E.V., Tereshkov P.P., Izmaytyev S.V. Endothelial dysfunction in experimental hyperhomocysteinemia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 42–46. (in Russ).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Funding.** The study had no sponsorship.

#### Information about authors:

Tsybikov N.N. <http://orcid.org/0000-0002-0975-2351>

Fefelova E.V. <http://orcid.org/0000-0002-0724-0352>

Tereshkov P.P. <http://orcid.org/0000-0002-8601-3499>

Izmaytyev S.V. <http://orcid.org/0000-0001-7550-1318>

Received 26.02.2015

## Введение

Широкое распространение и «омоложение» ишемической болезни сердца (ИБС) на фоне возрастающей общей продолжительности жизни населения определяет ее большую практическую и социальную значимость [1].

В патогенезе ИБС у лиц пожилого и старческого возраста ведущая роль принадлежит атеросклеротическому поражению коронарных артерий, у молодых лиц наряду с ранними атеросклеротическими изменениями выделяют и вазорегуляторные нарушения, приводящие к спазму коронарных артерий, дисфункции свертывающей и противосвертывающей систем крови с последующими тромбозами и тромбоэмболиями сосудов сердца, одной из причин которых является увеличение уровня гомоцистеина [2].

Механизмы неблагоприятного действия гомоцистеина (ГЦ) на сосудистое русло и систему гемостаза в настоящее время изучены недостаточно.

Предполагается, что повреждающее действие ГЦ на эндотелиальные клетки (ЭК) связано с окислительным стрессом, инактивацией оксида азота, угнетением активности глутатионпероксидазы и образованием окисленных форм липопротеинов низкой плотности [3].

Кроме того, ГЦ уменьшает антитромботический потенциал ЭК и увеличивает проагрегантное состояние тромбоцитов [4].

Целью исследования было изучение последствий дисфункции эндотелия, возникающей при экспериментальной гипергомоцистеинемии.

## Методика

Эксперимент выполнен на 42 белых беспородных крысах-самцах массой 150 г, одного возраста. Всех животных разделили на 2 группы по 21 в каждой. Крыс содержали в условиях вивария. Все эксперименты проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и «Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей».

Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) у опытных животных создавали путем внутрибрюшинного введения гомоцистеина в дозе 0,1 мкмоль на 1 г массы 1 раз в сутки, взяв за основу модель гипергомоцистеинемии Иванова А.В. и соавт. [5]. Крысам контрольной группы внутрибрюшинно вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. Животные опытной группы получали гомоцистеин в течение 14 сут. Из эксперимента животных выводили передозировкой эфира.

Концентрацию гомоцистеина в сыворотке крови и лизате клеток определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовой детекцией [6]. Для получения мононуклеарной фракции клеток, кровь крыс фракционировали в 63%-ном растворе Перколл (GE Healthcare), центрифугируя при 400 г в течение 30 мин. Фракцию собирали и отмывали от Перколл в растворе PBS pH 7,4. Клетки подсчитывали на проточном цитофлуориметре «Cytomics FC-500» (Beckman Coulter, USA) используя 1-ю панель моноклональных антител IOTest (Beck-

man Coulter) для крысы. Лизат клеток получали путем заморозки — оттаивания.

Определение концентрации цитокинов IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17A в плазме крови крыс проводили с помощью системы мультиплексного анализа FlowCytomix 5 plex (BMS826FF) в комбинации с Simplex Kit (BMS8635FF) соответствующих аналитов для крыс (компания «Bender Medsystems», Австрия). Полученные пробы анализировали на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 («Beckman Coulter», США). Обработку цитометрических файлов осуществляли в программном обеспечении FlowCytomixPro 3.0 («Bender Medsystems», Австрия).

Коагулогические показатели определяли в крови, взятой из подключичной вены. Кровь стабилизировали 3,8%-ным раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Исследование проводили на программируемом оптико-механическом коагулометре Минилаб 701 с использованием наборов для определения тромбин-теста (ТВ), активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), растворимого фибрин мономерного комплекса (РФМК) производства НПО РЕНАМ, Россия.

Экспрессию тканевого фактора (ТФ) оценивали иммуногистохимическим методом. Исследование было выполнено с использованием парафиновых срезов миокарда экспериментальных животных биотин-стрептавидиновым иммунопероксидазным методом с крысиними моноклональными антителами к тканевому фактору производства Santa Cruz biotechnology (USA). Результат оценивали полуколичественно: как отрицательный, если окрашенных клеток определялось менее 10%, в остальных случаях, положительный результат оценивался количественно по шкале от 1 до 4 баллов. Шкала была построена следующим образом: 1 балл — 10—25% окрашенных клеток, 2 балла — 25—50% окрашенных клеток, 3 балла — 50—75% окрашенных клеток и 4 балла — более 75% окрашенных клеток, с расчетом критерия  $\chi^2$  (Хи-квадрат).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Statistica 6.1 (StatSoft). Данные представлены в виде медианы и межквартильных интервалов (25-го; 75-го перцентилей); сравнение зависимых выборок проводили с помощью критерия Вилкоксона; сравнение независимых выборок проводили с помощью U-критерия Манна—Уитни. Различия считали значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Гипергомоцистеинемия диагностируют в том случае, если уровень гомоцистеина в крови превышает 15 мкмоль/л [3]. Концентрация гомоцистеина в плазме крови в пределах 15—30 мкмоль/л свидетельствует об умеренной гипергомоцистеинемии, от 30 до 100 мкмоль/л — о промежуточной, а более 100 мкмоль/л — о тяжелой [7]. Содержание гомоцистеина у здоровых животных колеблется в тех же пределах, что и у человека [8]. В нашем исследовании, на 14-е сут. ежедневного введения гомоцистеина была воспроизведена умеренная гипергомоцистеинемия: содержание гомоцистеина в контроле составило 7,8 (6,02; 8,96) мкмоль/л, а в опытных образцах — 28,6 (20,5; 32,4). При этом уровень гомоцистеина внутри клеток не изменялся: в контрольной группе он составил 0,02 (0,00; 0,17), а в опытных группах — 0,03 (0,00; 0,60) нмоль/1 клетку.

Эндотелиальная дисфункция (ЭД) — прежде всего, дисбаланс между продукцией вазодилатирующих, ангиопротективных, антипролиферативных факторов (оксида азота (NO), простаглицина, тканевого активатора плазминогена, С-типа натрийуретического пептида и пр.), с одной стороны, и вазоконстрикторных, протромботических, пролиферативных факторов (эндотелина, тромбосана А<sub>2</sub>, ингибитора тканевого активатора плазминогена), с другой. Кроме этих показателей в качестве потенциальных маркеров ЭД рассматривается несколько субстанций, продукция которых может опосредованно отражать функцию эн-

Таблица 1

Содержание вазоактивных веществ в сыворотке крови крыс при ГГЦ, Ме (25; 75)

Показатель	Контрольная группа (n = 21)	Опытная группа (n = 21)
Эндотелин, фмоль/мл	2,83 (0,85; 3,52)	15,73 (12,25; 15,82) p = 0,005
Нитраты, мкмоль/л	101,00 (96,48; 110,50)	54,17 (34,09; 54,17) p = 0,005
Нитриты, мкмоль/л	87,50 (58,33; 95,83)	25,00 (23,01; 41,80) p = 0,005

Примечание. p — уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой

дотелия. Речь идет о таких показателях, как провоспалительные цитокины: интерлейкины (ИЛ)-1, ИЛ-6, ИЛ-8), фактор некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), фактор Виллебранда, селектины, С-реактивный белок и пр. [9]. Нами зарегистрировано развитие дисфункции эндотелия в опытной группе, проявляющаяся увеличением уровня эндотелина более чем в 5 раз и статистически значимым снижением концентрации нитратов и нитритов (табл. 1).

Известно, что эндотелин — самый мощный вазоконстриктор из известных на сегодняшний день. Резкое увеличение его уровня при ГГЦ приводит к нарушению перфузии органов и тканей, с возможным ишемическим повреждением клеток. Более того, вазоконстрикторный эффект эндотелина усиливается на фоне снижения концентрации основного вазодилатора — оксида азота, оцениваемое по уменьшению содержания его метаболитов — нитратов и нитритов.

Установлено, что эндотелиальные клетки миокарда крыс с ГГЦ резко увеличивают экспрессию тканевого фактора (ТФ) (табл. 2). Эта реакция прямо указывает на выраженную дисфункцию эндотелия [10] и не может не сопровождаться угрозой развития тромбоза. О возможном развитии последней свидетельствуют показатели коагулограммы у крыс с ГГЦ. У этих животных наблюдалось сокращение АЧТВ ( $p = 0,008$ ), тромбинового времени (ТВ)

( $p = 0,0076$ ) и возростала концентрация РФМК ( $p = 0,007$ ). В тесте АЧТВ заведомо максимально активированы внешний и внутренний путь коагуляции. Дополнительная активация внешнего пути свертывания крови возможна лишь в одном случае — появлении ТФ в кровотоке, что и было нами продемонстрировано при иммуногистохимическом исследовании эндотелиальных клеток миокарда крыс с ГГЦ. Об этом же может свидетельствовать и сокращение ТВ, что, несомненно, связано с усилением генерации тромбина, инициируемой интенсиным образованием протромбиназы из-за чрезмерной активации внешнего пути коагуляции ТФ. Увеличение же концентрации РФМК указывает на наличие внутрисосудистого свертывания крови у крыс с ГГЦ.

Вероятно, усиление экспрессии ТФ на эндотелиоцитах может быть обусловлено гиперпродукцией  $TNF\alpha$  и  $INF\gamma$ . Наиболее значительно в опытной группе увеличилось содержание фактора некроза опухоли ( $TNF\alpha$ ) — в 14 раз, концентрация  $INF\gamma$  возросла почти в 11 раз (табл. 3).

Таким образом, экспериментальная ГГЦ сопровождается выраженной дисфункцией эндотелия, что проявляется в повышении тромбогенных свойств крови. Причиной этого сдвига является экспрессия ТФ на эндотелиоцитах, что сопровождается сокращением АЧТВ, ТВ и повышением концентрации РФМК.

Таблица 2

Экспрессия тканевого фактора на эндотелиоцитах миокарда крыс при ГГЦ

Показатель	Контрольная группа (n = 21), % / $\pm$ SD	Опытная группа (n = 21), % / $\pm$ SD	Уровень статистической значимости
Экспрессия ТФ эндотелиоцитами (M $\pm$ SD)	0,62 $\pm$ 0,67	2,05 $\pm$ 0,81	Коэффициент Вилкоксона $p = 0,00028$
Менее 10% окрашенных клеток	47,6%	—	$\chi^2$ $p = 0,009$
10 — 25% окрашенных клеток	42,9%	28,6%	$\chi^2$ $p = 0,0018$
25 — до 50% окрашенных клеток	9,5%	38,0%	$\chi^2$ $p = 0,026$
50 — 75% окрашенных клеток	—	33,4%	$\chi^2$ $p = 0,033$

Таблица 3

Содержание цитокинов в сыворотке крови крыс при ГГЦ, Ме (25; 75)

Показатель	Контрольная группа (n = 21)	Опытная группа (n = 21)
$TNF\alpha$ , пг/мл	77,56 (0,00; 150,74)	1104,01 (860,05; 1350,81) $p = 0,003$
$INF\gamma$ , пг/мл	17,99 (4,05; 25,90)	191,53 (124,59; 228,12) $p = 0,0005$

Примечание. p — уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой.

У животных с ГГЦ регистрируется высокий уровень эндотелина и цитокинов, что также отражает процесс повреждения эндотелия при ГГЦ.

### References

1. Govorin A.V. Features of the development and progression of cardiovascular disorders in clinic of internal diseases. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2008; 2: 19-25.
2. Coboleva G.N., Fedulov V.K., Karpov Yu.A. Dysfunction of the endothelium of blood and its significance for prognosis in patients with cardiovascular diseases. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2010; 9 (2): 69-73.
3. Tsybikov N.N., Tsybikova N.M. The role of homocysteine in human pathology. *Usp ekhi sovremennoy biologii*. 2007; 127(5): 471-82.
4. Vinogradov V.L., Orel E.B., Vasil'ev S.A. Hyperhomocysteinemia as a factor in thrombotic risk (debate). *Tromboz, gemostaz i reologiya*. 2009; 3 (39): 13-20.

5. Ivanov A.V., Moskovtsev A.A., Martynova E.A., Savina G.D., Luzyanin B.P., Kubatiev A.A. General aminosulfides in rat plasma after intraperitoneal and subcutaneous administration of homocysteine. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2013; 4: 41-5.

6. Dutov A.A., Nikitin D.A., Fedotova A.A. Determination of homocysteine and cysteine in plasma / serum HPLC with UV detection method and solid phase extraction on a polymeric sorbent. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2010; T. 56, vyp. 5: 609-15.

7. Skvortsov Yu.I., Korol'kova A.S. Homocysteine as a risk factor for coronary heart disease (Review). *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal*. 2011; 7(3): 619-24.

8. Dayal S., Lentz S. Role of redox reactions in the vascular phenotype of hyperhomocysteinemic animals. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9 (11): 1899-909.

9. Smirnova V.Yu. *Diagnostic value of laboratory markers of endothelial damage in unstable angina*. avtoref. dis... kand. med. nauk. M., 2009.

10. Polyakova A.P. *Features of allelic polymorphism of genes associated with endothelial dysfunction in patients with early onset of venous thrombosis*. avtoref. dis... kand. med. nauk. Sankt-Peterburg, 2014.

### Сведения об авторах:

Цыбиков Намжил Нанзатович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО ЧГМА  
Терешков Павел Петрович, канд. мед. наук, зав. лаб. экспериментальной и клинической биохимии и иммунологии  
Изместьев Сергей Валерьевич, канд. мед. наук, ассистент каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО ЧГМА