

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616-092.9:615.322

Банзаракшеев В.Г. ¹, Разуваева Я.Г. ²

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ И ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ФАРМАКОКОРРЕКЦИИ ИНДУЦИРОВАННОЙ ДИСЛИПИДЕМИИ

¹ ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет»
(670002, г. Улан-Удэ, ул. Октябрьская, 36а, Россия)² ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН
(670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6, Россия)

В статье представлены результаты патофизиологической и патоморфологической оценки фитотерапии при экспериментальной дислипидемии. Дислипидемию вызывали у крыс назначением атерогенной диеты в течение 12 недель. Эффективность фармакотерапии оценивали с помощью комплексного фитосредства, полученного по прописям рецептуры тибетской медицины. Изучаемое средство вводили животным в форме отвара внутривентрикулярно в объеме 1 мл на 100 г массы 1 раз в сутки на протяжении всего срока эксперимента. Животные контрольной группы получали эквивалентное количество воды очищенной по аналогичной схеме. Индукция дислипидемии приводила к значительным патоморфологическим изменениям со стороны аорты в виде нарушения целостности всех её оболочек, выраженного отёка адвентициального слоя, расстройства архитектоники эластических волокон в форме набухания, разволокнения и интерстициального отёка. Наряду с этим, отмечались существенные сдвиги морфометрических показателей аорты в виде возрастания толщины *t. adventitia* в 1,4 раза, увеличения суммарной ширины *t. intima* и *t. media* на 20 % и на 30 % общей толщины стенки аорты. Помимо этого, индуцированная дислипидемия характеризовалась повышением количества циркулирующих эндотелиальных клеток в 2,17 раза и активацией агрегационной способности тромбоцитов в среднем на 17,6 %. Одновременно с этим, при профилактическом введении фитосредства в аорте крыс наблюдались сохранность архитектоники эластических волокон, менее выраженный отёк интерстиция, локальная десквамация эндотелия и отсутствие клеточной инфильтрации. Кроме того, курсовая фитотерапия сопровождалась у лабораторных животных снижением в крови до 38 % уровня циркулирующих эндотелиоцитов и удлинением времени агрегации тромбоцитов в среднем на 30 %.

Ключевые слова: дислипидемия, патоморфологические изменения, циркулирующие эндотелиальные клетки, агрегация тромбоцитов, фитосредство

PATHOPHYSIOLOGICAL AND PATHOMORPHOLOGICAL EVALUATION OF THE PHARMACOCORRECTION OF INDUCED DISLIPIDEMIA

Banzaraksheev V.G. ¹, Razuvaeva Y.G. ²¹ Buryat State University (670002, Ulan-Ude, ul. Oktyabrskaya, 36a, Russian Federation)² Institute of General and Experimental Biology SB RAS
(670047, Ulan-Ude, ul. Sakhyanova, 6, Russian Federation)

The article presents the results of pathophysiological and pathomorphological evaluation of effectiveness of pharmacotherapy in experimental dyslipidemia. Dyslipidemia was induced in rats by prescribing the atherogenic diet for 12 weeks. Pharmacotherapeutic effectiveness of the complex plant remedy based on Tibetan medicine was studied. The tested remedy in the form of decoction was introduced intragastrically in the dose of 1 mL per 100 g of weight once a day during the whole period of the experiment. The control group received the distilled water according to the same scheme. It is established that atherogenic dyslipidemia was accompanied by structural changes in all membranes of aorta in the form of edema, leukocyte infiltration and desquamation of endothelial cells. Morphometric parameters of aorta were characterized by increasing thickness of *t. adventitia*, the total width of *t. intima* and *t. media*, as well as the total thickness of aortic wall. In the blood of animals the level of circulating endothelial cells increased by 2,17 times, platelet aggregation increased by 17,6 % on average. The prescription of phytoremedy reduced the severity of pathomorphological and morphometrical changes in aorta, decreased the content of circulating endothelial cells in blood by 38 %, inhibited platelet aggregation by 30 % on average.

Key words: dyslipidemia, pathomorphological changes, circulating endothelial cells, platelet aggregation, phytoremedy

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день атеросклероз и ассоциированные с ним заболевания являются основной причиной инвалидизации и высокой смертности

населения в большинстве стран мира, в том числе и России [2]. По мнению исследователей, складывающаяся неблагоприятная ситуация обусловлена ростом распространённости факторов риска ате-

росклероза, среди которых лидирующие позиции занимает дислипидемия [5]. Общеизвестно, что основная патофизиологическая роль дислипидемии заключена в её проатерогенной стимуляции и инициации дисфункционального состояния эндотелия [7]. В последующем деэндотелизация в синергизме с другими вазотоксическими компонентами вносит дополнительный вклад в процесс повреждения эндотелия и прогрессирование атеросклероза [11]. Несомненно, что одним из путей прерывания такого «порочного круга» расстройств способна выступить комплексная фармакотерапия, включающая в себя антидислипидемическую и эндотелиопротективную фармакокоррекцию [9]. В этом плане большой интерес представляет применение многокомпонентных фитосредств, оказывающих комплексное воздействие не только на очаг поражения, но и на общий баланс функциональных систем организма [3].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Патофизиологическая и патоморфологическая оценка эффективности фармакотерапии при индуцированной дислипидемии у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 24 крысах линии Wistar обоего пола с исходной массой 180–190 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при одинаковом уходе и питании, световом и температурном режиме в соответствии с Приказом МЗ РФ № 708Н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Экспериментальные исследования проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г.) и «Правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных» (Страсбург, 1986). Экспериментальные исследования согласованы с этическим комитетом Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (протокол № 6 от 12.10.2016 г.).

Лабораторные животные с учётом пола, возраста, массы и принципа рандомизации были распределены на 3 группы по 8 животных: I группа – интактная группа крыс, содержащаяся в условиях вивария на стандартном режиме и питании со свободным доступом к воде, II группа – контрольная группа крыс, находившаяся на атерогенной диете, III группа – опытная группа крыс, получавшая испытуемое фитосредство на фоне индуцированной дислипидемии. Дислипидемия была индуцирована путём назначения лабораторным животным атерогенной диеты в течение 12 недель [9]. Для оценки фармакотерапевтической эффективности дислипидемии использовали комплексное фитосредство, полученное по прописям рецептуры, описанной в первоисточнике тибетской медицины, трактате «Чжуд-ши» [10]. В состав средства входят корневища *Zingiber officinalis L.*, плоды *Rosa cinnamomea L.*, корнеплоды *Beta vulgaris L.*, плоды *Malus baccata (L) Borkh.*, плоды *Crataegus sanguinea Pall.*, корневища *Glycyrrhiza glabra L.*, кора *Cinnamomum cassia Blume* и др. Фитосредство вводили крысам в

форме отвара внутрижелудочно в объёме 1 мл на 100 г массы 1 раз в сутки на протяжении всего срока эксперимента [9]. Животные контрольной группы получали эквивалентное количество воды очищенной по аналогичной схеме. Через 12 недель от начала опытов лабораторные животные были выведены из эксперимента методом мгновенной декапитации под лёгким эфирным наркозом.

Состояние дисфункции эндотелия оценивали путём определения уровня циркулирующих эндотелиальных клеток по методу Hladovec [12]. Проконгулянтный потенциал крови изучали по состоянию тромбоцитарного звена гемостаза с подсчётом количества тромбоцитов на гематологическом анализаторе «Mythic-18» и определением их функциональных свойств по агрегоскрин-тесту и АДФ-индуцированной агрегации диагностическими наборами «Технология-Стандарт» [6].

Для проведения патоморфологических исследований сосуды фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина с последующей заливкой их в парафин. Приготовленные на криостате парафиновые срезы окрашивали гематоксилин-эозином и орсеином. На полученных срезах осуществляли морфологические и морфометрические исследования с помощью микроскопа с программным обеспечением «Axio LAB.A1» [4].

Полученные в ходе экспериментов данные статистически обработаны общепринятыми методами, значимость различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ранее проведённых нами исследованиях было установлено, что дислипидемия, вызванная у крыс назначением атерогенной диеты, сопровождалась существенными изменениями показателей липидного обмена [1]. В частности, липидограмма животных характеризовалась гипертриглицеридемией, а также возрастанием уровня атерогенных, в том числе, модифицированных форм липопротеинов низкой плотности и снижением содержания антиатерогенной фракции липопротеинов высокой плотности.

Несомненно, что любые изменения липидного дисметаболизма напрямую взаимосвязаны со структурной перестройкой органов-мишеней обмена липидов, в частности сосудов [11]. Так, в ходе патоморфологических исследований у животных контрольной группы были выявлены нарушения целостности всех оболочек аорты, при этом интенсивность расстройств была разной степени выраженности. К примеру, у 6 из 8 животных отмечался значительный объём периваскулярной жировой ткани, чего не наблюдалось ни у одного животного интактной группы (рис. 1). При этом следует отметить, что большая часть клеток жировой ткани по типу «ксантоновых клеток» имела пенистую цитоплазму, содержащую одну крупную каплю жира и эксцентрично расположенное ядро. В литературе есть сведения о том, что эти клетки являются не макрофагами, а жировыми клетками с эмульгированными в них липидами и с высокой

способностью их к миграции в субэндотелиальный слой [11]. Помимо этого, у контрольных животных наблюдался выраженный отёк адвентициального слоя, в результате чего соединительная ткань была неоднородна по своей структуре, разволокнена и инфильтрирована полиморфноядерными и мононуклеарными лейкоцитами (рис. 2).

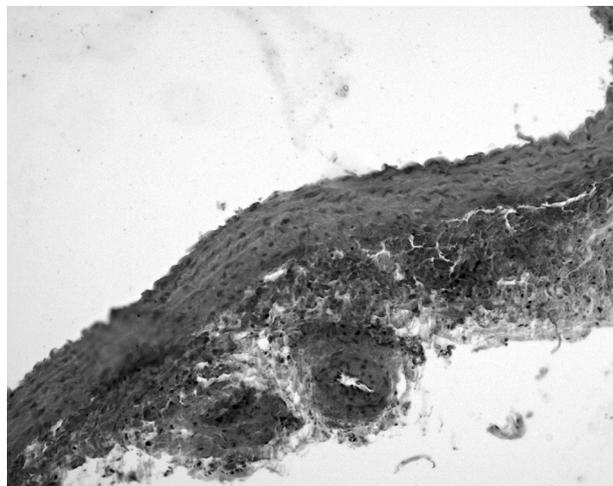


Рис. 1. Аорта крысы интактной группы. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение 10×10.

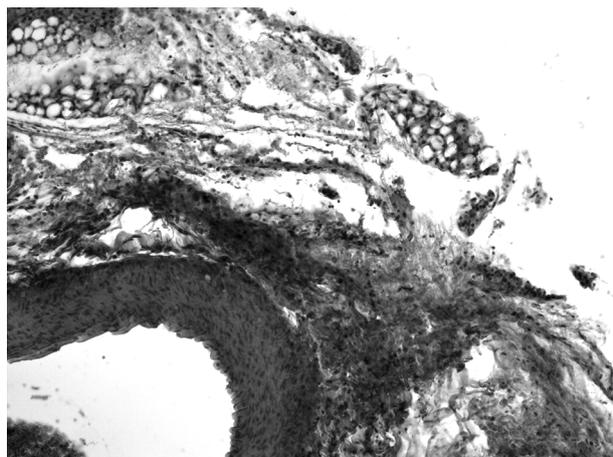


Рис. 2. Аорта крысы контрольной группы. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение 10×40.

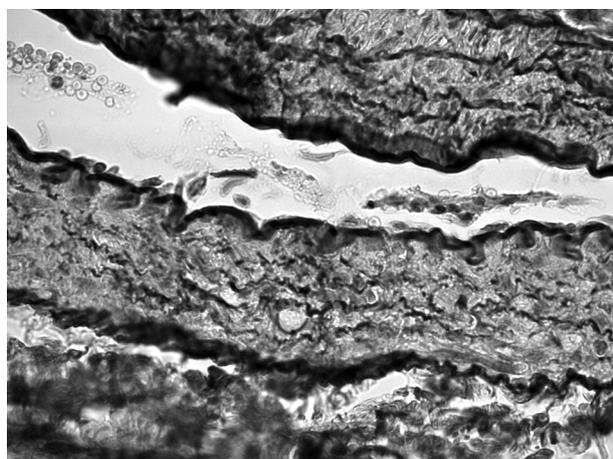


Рис. 3. Аорта крысы контрольной группы. Окраска орсеином. Увеличение 10×40.

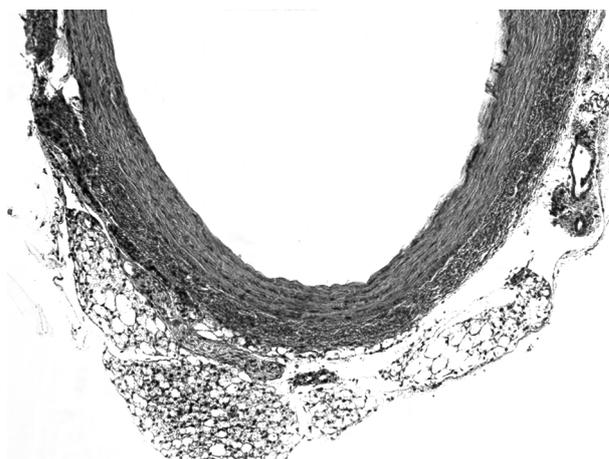


Рис. 4. Аорта крысы опытной группы. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение 10×40.

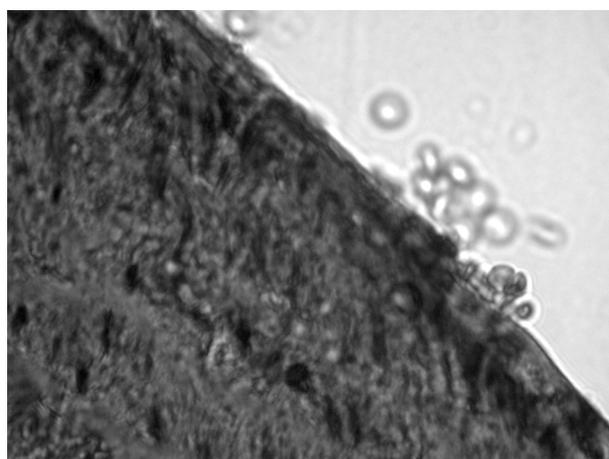


Рис. 5. Аорта крысы контрольной группы. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение 10×100.

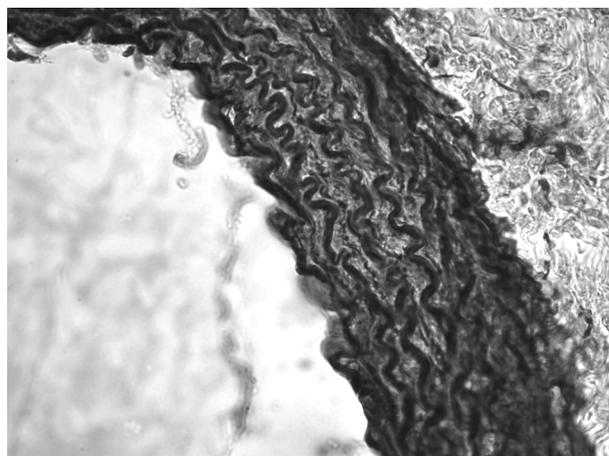


Рис. 6. Аорта крысы опытной группы. Окраска орсеином. Увеличение 10×40.

В связи с вызванными дислипидемией патоморфологическими изменениями со стороны аорты большой интерес представляла оценка морфометрических параметров стенки данного сосуда (табл. 1).

Как видно из таблицы 1, в контрольной группе крыс толщина адвентиции варьировала от 45 до 244 μm , что в среднем в 1,4 раза больше, чем в интактной группе, где изучаемый параметр составлял 41–159 μm . Наряду с этим, суммарная ширина *t. intima*

u. t. media у животных в контроле варьировала от 81 до 240 μm , что на 20 % больше, чем у животных интактной группы. Вместе с тем, общая толщина стенки аорты была на 30 % выше аналогичного показателя в интактном, поскольку колебания данного параметра находились в пределах от 130 до 380 μm . В интима аорты отмечались выраженные изменения в виде уплощения, гиперхромии и набухания эндотелиальных клеток.

Таблица 1
Морфометрические показатели аорты при индуцированной дислипидемии у крыс

Группы животных	Толщина <i>t. intima</i> + <i>t. media</i> , μm	Толщина <i>t. adventitia</i> , μm	Толщина стенки аорты, μm
Интактная (n = 8)	99,1 ± 3,41 (70–120)	89,6 ± 8,26 (41–159)	188,7 ± 9,01 (93–250)
Контрольная (n = 8)	119,2 ± 3,15 (81–240)	126,8 ± 9,88 (45–244)	246,0 ± 12,53 (130–380)
Опытная (n = 8)	109 ± 3,80 (82–132)	101,4 ± 5,28* (40–158)	210,5 ± 8,23* (123–270)

Примечание. * – здесь и далее разность достоверна по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$.

При изучении отходящих от аорты ветвей животных диет-индуцированной группы установлены существенные сдвиги в архитектонике эластических волокон, среди которых отмечались набухание, разволокнение и интерстициальный отёк. Кроме этого, в этих участках аорты при детальном морфогистологическом исследовании в *t. media* были визуализированы оптические пустые образования, характерные для липидов (рис. 3).

Одновременно с этим, профилактический приём фитосредства сопровождался тем, что параорганная жировая ткань наблюдалась лишь у 2 из 8 животных опытной группы (рис. 4). Кроме этого, в значительно меньшей степени был выражен отёк волокон и интерстиция оболочек аорты, в результате чего толщина стенки аорты была на 14 % меньше таковой по отношению к контрольной группе крыс (табл. 1). Следует отметить, что такая разница была обусловлена преимущественно размерами *t. adventitia*, поскольку толщина последней была на 20 % меньше, чем в контроле.

Нельзя не отметить, что при патоморфологическом изучении *t. intima* аорты контрольных животных обращало на себя внимание не только наличие дегенеративно изменённых эндотелиоцитов, но и усиленная их десквамация в просвет сосуда. В ходе дальнейших исследований было установлено, что в группе крыс, находившихся на атерогенной диете, наблюдалось повышение в крови количества циркулирующих эндотелиальных клеток – основных биомаркеров дисфункции эндотелия (табл. 2).

Таблица 2
Содержание циркулирующих эндотелиальных клеток при индуцированной дислипидемии у крыс

Группы животных	Количество циркулирующих эндотелиальных клеток, Ед./100 мкл
Интактная (n = 8)	5,7 ± 1,03
Контрольная (n = 8)	12,4 ± 3,15
Опытная (n = 8)	7,6 ± 0,3*

Как следует из результатов, приведённых в таблице 2, в контрольной группе животных степень дезэндотелизации сосудов возрастала в 2,2 раза по сравнению с данными в интактной группе крыс. Очевидно, что такая динамика патологического процесса свидетельствует о значительной активации дисфункционального состояния эндотелия и выраженности в нём необратимых деструктивных процессов [7, 12]. Общеизвестно, что одним из последствий повреждающего влияния дислипидемии на эндотелий служит его прокоагулянтная активация посредством агрегационного потенциала тромбоцитов [6]. Патоморфологически установлено, что на фоне десквамации дистрофически изменённых эндотелиоцитов наблюдалось нарастание числа тромбоцитов, а также выраженная их адгезия и агрегация вблизи люминальной поверхности интимы аорты (рис. 5). Бесспорно, что такая динамика патологического процесса свидетельствует о нарушении структурной целостности эндотелиального слоя с запуском в нём механизмов коагуляции (табл. 3).

Таблица 3
Показатели тромбоцитарного гемостаза при индуцированной дислипидемии у крыс

Показатели	Интактная (n = 8)	Контрольная (n = 8)	Опытная (n = 8)
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	506 ± 45,5	522,0 ± 33,8	512,0 ± 37,4
Агрескрин-тест, с.	18,5 ± 1,1	15,5 ± 0,2	19,8 ± 0,9
АДФ-агрегация, с.	18,5 ± 1,0	15,0 ± 1,3	20,2 ± 1,5

Из таблицы 3 следует, что атерогенная дислипидемия у крыс характеризовалась усилением функциональной способности тромбоцитов к агрегации без существенного изменения их количественного состава. Так, по сравнению с интактной группой у контрольных животных наблюдалось ускорение процесса агрегации кровяных пластинок на 16,2 % в агрескрин-тесте и на 19 % при АДФ-индуцированной агрегации. Вместе с тем, профилактический приём средства сопровождался снижением степени десквамации эндотелиоцитов у лабораторных животных, поскольку в опытной группе уровень циркулирующих эндотелиальных клеток уменьшался на 38 % по сравнению с контролем. Кроме этого, курсовое введение фитосбора удлиняло время агрегации тромбоцитов на 27 % в агрескрин-тесте и на 34 % при АДФ-индуцированной агрегации. Благоприятный эффект фитотерапии сопровождался ещё и тем, что в *t. intima* и *t. media* была сохранена архитектоника эластических волокон, не наблюдалось признаков клеточной инфильтрации, десквамация эндотелия и адгезия форменных элементов была лишь локальной, перинуклеарные оптические пустые образования в стенке сосуда не визуализировались (рис. 6).

Таким образом, результаты исследований показали, что дислипидемия инициирует патофизиологические и патоморфологические изменения, характерные для дисфункционального состояния эндотелия – патогенетической основы атерогенеза. Установлено, что профилактический приём фитосредства оказывает комплексный фармакологический эффект путём снижения степени десквамации эндо-

телиоцитов, ослабления прокоагулянтного потенциала эндотелия, а также уменьшения выраженности патоморфологических изменений в аорте. По всей видимости, фармакотерапевтическая эффективность фитосбора обусловлена содержанием в его компонентах комплекса биологически активных соединений, обеспечивающих выраженный поливалентный эффект средства [3]. Можно предположить, что наличие в испытуемом фитосредстве данных фармакологических свойств способно открыть новые возможности в комплексной профилактике и терапии атеросклероза.

**ЛИТЕРАТУРА
REFERENCES**

1. Банзаракшеев В.Г., Седунова Е.Г. Патологическая оценка состояния антиоксидантной системы организма крыс при дислипидемии // Сибирский медицинский журнал. – 2016. – № 1. – С. 29–31.
- Banzarakshiev VG, Sedunova EG. (2016). Pathophysiological assessment of the antioxidant system in rats organisms in dyslipidemia [Patofiziologicheskaya otsenka sostoyaniya antioksidantnoy sistemy organizma krys pri dislipidemii]. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*, (1), 29-31.
2. Бойцов С.А. Актуальные направления и новые данные в эпидемиологии и профилактике неинфекционных заболеваний // Терапевтический архив. – 2016. – № 1. – С. 4–10.
- Boytsov SA. (2016). Recent trends in and new data on the epidemiology and prevention of non-communicable diseases [Aktual'nye napravleniya i novye dannye v epidemiologii i profilaktike neinfektsionnykh zabolevaniy]. *Terapevticheskiy arkhiv*, (1), 4-10.
3. Головкин Б.Н., Руденская Р.Н., Трофимова И.А. Биологически активные вещества растительного происхождения. – М.: Медицина, 2001. – 764 с.
- Golovkin BN, Rudenskaya RN, Trofimova IA. (2001). Biologically active agents of phytogenesis [Biologicheskii aktivnye veshchestva rastitel'nogo proiskhozhdeniya]. Moskva, 764 p.
4. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. – СПб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
- Korzhevsky DE, Gilyarov AV. (2010). Fundamentals of histological techniques. [Osnovy gistologicheskoy tekhniki]. Sankt-Peterburg, 95 p.
5. Кухарчук В.В. Дислипидемии и сердечно-сосудистые заболевания // Consilium Medicum. – 2009. – № 5. – С. 61–64.

- Kukharchuk VV. (2009). Dislipidemia and cardiovascular diseases [Dislipidemii i serdechno-sosydistye zabolevaniya]. *Consilium Medicum*, (5), 61-64.
6. Морозова В.Т., Авдеева Н.А. Коагулологические синдромы. – М.: Форте-Принт, 2014. – 149 с.
- Morozova VT, Avdeeva NA. (2014). Coagulologic syndromes [Koagulologicheskie sindromy]. Moskva, 149 p.
7. Никитин Ю.П., Симонова Г.И., Хорева М.А., Воробьев Р.И. Роль дисфункции эндотелия в патогенезе атеросклероза // Атеросклероз. – 2011. – № 1. – С. 60–69.
- Nikitin YP, Simonova GI, Khoreva MA, Vorobyov RI. (2011). Role of endothelial dysfunction in pathogenesis of atherosclerosis [Rol' disfunktsii endoteliya v patogeneze ateroskleroza]. *Ateroskleroz*, (1), 60-69.
8. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. – М.: Гэотар Медицина, 2001. – 256 с.
- Sergienko VI, Bondareva IB. (2001). Mathematical statistics in clinical researches [Matematicheskaya statistika v klinicheskikh issledovaniyakh]. Moskva, 256 p.
9. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
- Khabriev RU. (2005). Guidebook for experimental (pre-clinical) study of new pharmacological substances [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniju novykh farmakologicheskikh veshchestv]. Moskva, 832 p.
10. Чжуд-ши: канон тибетской медицины / Перевод с тибетского, пред., прим., указатели Д.Б. Дашиева. – М.: Восточная литература РАН, 2001. – 766 с.
- Zhud-shi: Foundations of Medical Science of Tibet / Trans. from Tibetan, preface, notes and indexes are performed by D.B. Dashiev. (2005). [Chzhud-shi: kanon tibetskoy meditsiny]. Moskva, 766.
11. Федченко Н.П., Федченко Н.Н. Теоретические и морфологические закономерности патогенеза атеросклероза и основных его осложнений. Новые подходы к их профилактике и лечению // Морфология. – 2009. – Т. 3, № 1. – С. 14–21.
- Fedchenko NP, Fedchenko NN. (2009). Theoretical and morphological mechanisms of pathogenesis of atherosclerosis and its complications. New ways of their precaution and treatment [Teoreticheskie i morfologicheskie zakonornosti patogeneza ateroskleroza i osnovnykh ego oslozhneniy. Novye podhody k ih profilaktike i lecheniyu]. *Morfologiya*, (1), 14-21.
12. Hladovec J. (1978). The method of study of endothelial dysfunction. *Physiol. Bohemosv.*, 27, 140-144.

**Информация об авторах
Information about the authors**

Банзаракшеев Виталий Гамбалович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры общей патологии человека медицинского института Бурятского государственного университета (670002, г. Улан-Удэ, ул. Октябрьская, 36а, тел. (3012) 28-39-26; e-mail: gambalovi4@mail.ru)

Banzarakshiev Vitaliy Gambalovich – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor at the Department of General Human Pathology of the Medical Institute at Buryat State University (670002, Ulan-Ude, ul. Oktyabrskaya, 36a, tel. (3012) 28-39-26; e-mail: gambalovi4@mail.ru)

Разуваева Янина Геннадьевна – доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории безопасности биологически активных веществ Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6; тел. (3012) 43-37-13; e-mail: tatur75@mail.ru)

Razuvaeva Yanina Gennadyevna – Doctor of Biological Sciences, Senior Research Officer at the Laboratory of Safety of Biologically Active Substances of the Institute of General and Experimental Biology SB RAS (670047, Ulan-Ude, ul. Sakhyanova, 6; tel. (3012) 43-37-13; e-mail: tatur75@mail.ru)