

Состояние эндотелия и уровень нейронспецифических маркеров повреждения нервной ткани у крыс при хронической интоксикации карбофосом и способы коррекции

Д.В. Срубиллин, М.А. Исакова, А.Д. Срубиллин, Д.А. Еникеев, М.К. Игнатова

*Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России
450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3*

Резюме

Состояние эндотелия сосудов, выраженность нейродегенеративных процессов, их взаимосвязь, а также возможные способы коррекции при хронической интоксикации карбофосом практически не исследованы. Цель настоящей работы – изучить в динамике морфологическое и функциональное состояния эндотелия, уровень маркеров повреждения ткани головного мозга у крыс при хронической интоксикации карбофосом, оценить эффективность в качестве средств коррекции низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ), комплексного соединения 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой (ОМУ-ЯК), препарата L-аргинина. **Материал и методы.** Эксперименты проведены на самцах крыс, у которых моделировали хроническую интоксикацию путем внутрижелудочного введения карбофоса в дозе 0,05 LD₅₀ ежедневно в течение 90 суток. Исследовали уровни оксида азота (NO), эндотелина-1, нитротирозина, циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов (ЦДЭ), нейронспецифической енолазы (HSE), белка S-100 в сыворотке крови на 30-е, 60-е, 90-е и 120-е сутки эксперимента. **Результаты и их обсуждение.** На фоне хронической интоксикации карбофосом у крыс развиваются признаки эндотелиальной дисфункции, которые проявляются в виде прогрессирующего нарастания уровня ЦДЭ, эндотелина-1, нитротирозина и снижения концентрации NO, также развиваются нейродегенеративные процессы и повышается проницаемость гематоэнцефалического барьера: уровни HSE и S-100 на 90-е сутки увеличиваются в 1,65 и 2,09 раза соответственно. Установлена зависимость между степенью дисфункции эндотелия и выраженностью нейродегенеративных процессов в головном мозге, которая имеет временную зависимость; морфологические и функциональные изменения эндотелия предшествуют нейродегенеративным. НИЛИ, ОМУ-ЯК, препарат L-аргинина (в наибольшей степени при их совместном применении) уменьшают содержание HSE и S-100 в сыворотке крови как на 90-е сутки хронической интоксикации карбофосом, так и на 120-е сутки в постинтоксикационном периоде, что свидетельствует о снижении проявлений воспалительной реакции в веществе головного мозга. **Заключение.** Хроническая интоксикация карбофосом сопровождается ЭД и нейродегенерацией, выраженность которых уменьшает комбинированное применение НИЛИ, ОМУ-ЯК и L-аргинина.

Ключевые слова: карбофос, лазерное излучение, янтарная кислота, крысы, эндотелий, нейронспецифические белки, эндотелин-1.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Срубиллин Д.В., e-mail: srubilin66@mail.ru

Для цитирования. Срубиллин Д.В., Исакова М.А., Срубиллин А.Д., Еникеев Д.А., Игнатова М.К. Состояние эндотелия и уровень нейронспецифических маркеров повреждения нервной ткани у крыс при хронической интоксикации карбофосом и способы коррекции. *Сиб. науч. мед. ж.* 2025;45(5):237–246. doi: 10.18699/SSMJ20250521

The state of the endothelium and the level of neuron-specific markers of nerve tissue damage in rats with chronic malathion intoxication and methods of correction

D.V. Srubilin, M.A. Isakova, A.D. Srubilin, D.A. Enikeev, M.K. Ignatova

*Bashkir State Medical University of Minzdrav of Russia
450008, Ufa, Lenina str., 3*

Abstract

The state of the vascular endothelium, the severity of neurodegenerative processes, their relationship, as well as possible correction methods for chronic malathion intoxication have not been practically studied. The aim of the work was to study the dynamics of the morphological and functional state of the endothelium, the level of markers of brain tissue damage in rats with chronic malathion intoxication, to evaluate the effectiveness of low-intensity laser radiation (LILR), a complex compound of 5-oxy-6-methyluracil with succinic acid (OMU-SA), and L-arginine preparation as correction agents. **Material and methods.** The experiments were conducted on male rats in which chronic intoxication was simulated by intragastric administration of malathion at a dose of 0.05 LD50 daily for 90 days. The levels of nitric oxide (NO), endothelin-1, nitrotyrosine, circulating desquamated endothelial cells (CDEC), neuron-specific enolase (NSE), and protein S-100 in blood serum on days 30, 60, 90, and 120 of the experiment were studied. **Results and discussion.** Against the background of chronic intoxication with malathion, rats develop signs of endothelial dysfunction, which are manifested in the form of a progressive increase in the level of CDEC, endothelin-1, nitrotyrosine and a decrease in NO concentration, neurodegenerative processes also develop and the permeability of the blood-brain barrier increases: NSE and protein S-100 levels on day 90 they increase by 1.65 and 2.09 times, respectively. A relationship has been found between the degree of endothelial dysfunction and the severity of neurodegenerative processes in the brain, which has a time dependence; morphological and functional changes in the endothelium precede neurodegenerative changes. LILR, OMU-SA, and the L-arginine preparation correct endothelial dysfunction to the greatest extent when they are used together, as a result of which the content of NSE and protein S-100 in the blood serum is reduced both on day 90 of chronic intoxication malathion and on day 120 in the post-intoxication period, which indicates a decrease in the manifestations of an inflammatory reaction in the brain substance. **Conclusions.** Chronic intoxication with malathion is accompanied by endothelial dysfunction and neurodegeneration, the severity of which is reduced by the combined use of LILI, OMU-SA and L-arginine.

Key words: malathion, laser radiation, succinic acid, rats, endothelium, neuron-specific proteins, endothelin-1.

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

Correspondence author. Srubilin D.V., e-mail: srubilin66@mail.ru

Citation. Srubilin D.V., Isakova M.A., Srubilin A.D., Enikeev D.A., Ignatova M.K. The state of the endothelium and the level of neuron-specific markers of nerve tissue damage in rats with chronic malathion intoxication and methods of correction. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2025;45(5):237–246. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20250521

Введение

Современная наука уделяет значительное внимание исследованию механизмов воздействия различных экзотоксинов на организм человека, а также поиску методов коррекции возникающих вследствие этого патологических изменений. Особого внимания заслуживают фосфорорганические соединения, в частности карбофос, который широко используется в качестве инсектицида и акарацида. Карбофос при длительном воздействии способен приводить к хронической интоксикации, особенно среди работников сельского хозяйства и лиц, проживающих вблизи сельскохозяйственных угодий [1]. Существует значительное количество работ, которые изучают действие фосфорорганических соединений при острых отравлениях. Однако исследований действия небольших доз фосфорорганических инсектицидов, поступающих в организм в течение длительного времени, недостаточно. Анализ современной литературы показывает, что существует значительная потребность в более глубо-

ком изучении токсичности фосфорорганических инсектицидов при хронических интоксикациях.

Одной из наиболее уязвимых структур при хронической интоксикации карбофосом является сосудистое русло. Эндотелий, слой клеток, выстилающий внутреннюю поверхность кровеносных и лимфатических сосудов, играет важную роль в регуляции тонуса сосудов, свертываемости крови, воспалении и иммунном ответе. В условиях хронической интоксикации карбофосом состояние эндотелия может значительно изменяться, что приводит к развитию патологических состояний. Чем дольше сохраняется патологический ответ, тем быстрее происходит хронизация процесса, и необратимые изменения стабилизируются. Первоначально в эндотелии развиваются функциональные изменения и лишь затем формируются морфологические [2]. В данной работе мы рассмотрим влияние хронического воздействия карбофоса на структуру и функции эндотелия сосудов, а также возможные последствия этих изменений для организма.

Эндотелий является важной частью гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), повреждение которого может лежать в основе нейрососудистой дисфункции и развития патологических изменений в головном мозге. Для подтверждения повреждения тканей головного мозга изучают нейронспецифические маркеры, уровень которых коррелирует с выраженностью нейродеструкции и проницаемости ГЭБ [3, 4]. Ряд авторов в ходе изучения хронического действия фосфорорганических соединений выявили у животных поведенческие нарушения, которые были связаны с гибелью нейронов вследствие их окислительного повреждения [5–7]. Карбофос при хроническом поступлении в организм вызывает развитие окислительного стресса и формирует поведенческие нарушения у крыс, проявления которых зависят от их индивидуально-типологических особенностей, от пола [8, 9]. Одним из факторов, повреждающих эндотелий, является активация свободнорадикального окисления, что подтверждается наличием связи между маркерами окислительного стресса и эндотелиальной дисфункцией [10].

Своевременное выявление эндотелиальной дисфункции и проведение профилактических мероприятий, направленных на ее коррекцию, когда патологический процесс еще обратим, может значительно улучшить прогноз. В ранее проведенных исследованиях нами выявлено соединение – комплекс 5-гидрокси-6-метилурацила с янтарной кислотой (ОМУ-ЯК), которое обладает антиоксидантной, антигипоксической активностью и способно уменьшать проявления эндотелиальной дисфункции [11]. Низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ), применяемое в медицине для лечения различных патологий, привлекает внимание исследователей благодаря своим противовоспалительным, регенерирующим и антиоксидантным свойствам. Способность НИЛИ улучшать функцию эндотелия продемонстрирована в ряде исследований [12]. В контексте хронической интоксикации карбофосом изучение влияния НИЛИ на состояние сосудистого эндотелия приобретает особую актуальность. Лазерная терапия может способствовать восстановлению функции эндотелия, улучшению микроциркуляции и снижению выраженности окислительного стресса, что потенциально способно замедлить прогрессирование нейродегенерации.

Цель исследования – изучить в динамике морфологическое и функциональное состояние эндотелия и уровень повреждения ткани головного мозга и проницаемости ГЭБ у крыс при хронической интоксикации карбофосом и в отдаленном постинтоксикационном периоде и оценить эффективность НИЛИ, ОМУ-ЯК и препарата

L-аргинина, а также их комбинированное воздействие в коррекции выявленных изменений.

Материал и методы

В качестве объекта исследования использовались самцы беспородных белых крыс в возрасте 6 месяцев с массой тела 220–250 г. В ходе эксперимента животные имели свободный доступ к воде и корму, лишенному нитратов. Экспериментальная работа проведена с соблюдением этических принципов, установленных Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (принятой в Страсбурге 18.03.1986), а также «Международных рекомендаций (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1986). Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствуют нормативам, определенным в Приказе Минздрава России №199н от 01.04.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом Башкирского государственного медицинского университета (протокол № 4 от 16.04.2025).

Подопытные крысы были разделены на следующие группы: группа 1 – интактные ($n = 6$); группа 2 – с хронической интоксикацией карбофосом ($n = 24$); группа 3 – с хронической интоксикацией карбофосом и введением препарата L-аргинина ($n = 12$); группа 4 – с хронической интоксикацией карбофосом и введением ОМУ-ЯК ($n = 12$); группа 5 – с хронической интоксикацией карбофосом и получавшие курс НИЛИ ($n = 12$); группа 6 – с хронической интоксикацией карбофосом и введением препарата L-аргинина, ОМУ-ЯК и получившие курс НИЛИ ($n = 12$). С целью моделирования хронической интоксикации крысам внутрижелудочно вводили карбофос (ООО «ПСК Техноэкспорт») в дозе 25 мг/кг ($0,05 LD_{50}$) ежедневно в течение 90 суток. Животные групп 1, 3, 4, 5, 6 в аналогичных условиях получали дистиллированную воду. Для определения дозы LD_{50} использовали метод пробит-анализа Литчфильда и Уилкоксона.

Препарат L-аргинина (25 мг/кг) и ОМУ-ЯК (50 мг/кг) вводили перорально в течение 12 суток двумя курсами, начиная с 3-й и с 10-й недели хронической интоксикации карбофосом. Использовали коммерческий препарат L-аргинин (Natures Bounty, США). Синтез комплексного соединения ОМУ-ЯК осуществлен в Уфимском институте химии УФИЦ РАН к.х.н. Гимадиевой А.Р. Курс лазеротерапии проводили 2-кратно начиная с 3-й и с 10-й недели продолжительностью по 12 дней. Использовался аппарат лазерной терапии «Ма-

трикс» (НИЦ «Матрикс») с зеркальной насадкой для воздействия в области печени контактной методикой и акупунктурной насадкой для надвенозного облучения крови в области хвостовой вены. При проведении процедуры тело животного фиксировали с помощью специально разработанного нами устройства и экранировали плотной белой бумагой с отверстием диаметром 1,0 см в области экспонируемого участка, шерсть на котором предварительно выбривали. Животных контрольной группы подвергали таким же воздействиям за исключением того, что аппарат был выключен. Лазерную терапию проводили сочетанием двух длин волн излучения импульсных лазеров: в области печени – при длине волны излучения 0,89 мкм (средняя импульсная мощность 7 Вт, частота следования импульсов 80 Гц, длительность импульса 100 нс, разовая доза облучения 0,01 Дж/см²), в проекции хвостовой вены – при длине волны излучения 0,63 мкм (импульсная мощность 5 Вт, частота следования импульсов 80 Гц, разовая доза облучения 0,012 Дж/см²). При выборе режимов НИЛИ ориентировались на данные литературы [13].

Все эксперименты проводились в осенне-зимний период. Кровь для исследования забирали в утренние часы, часть стабилизировали гепарином (150–200 Ед/мл) для получения плазмы, часть использовали для приготовления сыворотки. Предварительно вечером крыс лишали пищи. Животных выводили из эксперимента способом краниоцервикальной дислокации под легким эфирным наркозом. Показатели анализировали на 30-е, 60-е, 90-е сутки хронической интоксикации карбофосом, а также спустя 30 дней после окончания его назначения. Выбранные нами дозы и режим воздействия должны были смоделировать эффекты в процессе длительного времени, в том числе и в отсроченный период.

Функциональное и морфологическое состояние эндотелия оценивали по уровню оксида азота (NO), эндотелина-1, нитротирозина и циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов (ЦДЭ). Количество NO в плазме крови оценивали по содержанию его стабильных метаболитов, суммы нитратов и нитритов: нитраты восстанавливали в нитриты с помощью хлорида ванадия (III), проводили реакцию диазотирования образовавшимся нитритом сульфаниламида, входящего в состав реактива Грисса, с последующим определением интенсивности окраски при длине волны 540 нм на спектрофотометре СФ-56 («ОКБ Спектр») [14]. Для определения ЦДЭ стабилизированную гепарином кровь центрифугировали 10 минут при 1000 оборотов в минуту с целью получения плазмы, богатой эндотелиальными клетками и тром-

боцитами. В дальнейшем тромбоциты осаждали АДФ, плазму центрифугировали при 1000 об/мин. Полученный поверхностный слой плазмы для получения эндотелиальных клеток центрифугировали 15 минут при 3000 об/мин. Полученный осадок суспендировали в 0,1 мл 0,9 % раствора хлорида натрия и заполняли камеру Горяева для подсчета в двух сетках методом фазово-контрастной микроскопии. Для пересчета количества ЦДЭ на 1 литр плазмы учитывали объем двух сеток камеры Горяева, степень сгущения плазмы крови [15]. Содержание эндотелина-1, нитротирозина, нейронспецифической енолазы (НСЕ), белка S-100 в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с использованием наборов Big Endothelin-1 ELISA (Biomedica, Австрия), 3-NT ELISA KIT, NSE ELISA KIT (Cusabio, КНР), S-100 ELISA KIT (Cusabio) соответственно согласно инструкциям производителей на автоматическом анализаторе «Униплан АИФР-01» (ЗАО «ПИКОН», Россия).

Обработку полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 10.0 (Stat Soft, США). Данные в таблицах представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей (Me [Q1; Q3]). Статистическую значимость различий между группами крыс определяли с помощью критерия Манна – Уитни. Корреляционные связи между изучаемыми показателями исследовали с помощью коэффициента ранговой корреляции *r* Спирмена. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (*p*) принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

Исследования проведены в два этапа. Предварительно выполнена серия экспериментов с животными, получавшими препарат L-аргинин, ОМУ-ЯК и курс НИЛИ, по указанным в разделе «Материал и методы» схемам, статистически значимых различий по уровню NO, эндотелина-1, нитротирозина, ЦДЭ, НСЕ и белка S-100 с интактными крысами не выявлено. В дальнейших исследованиях сравнения показателей проводили с животными интактного контроля. На первом этапе оценили состояние эндотелия и уровень нейронспецифических маркеров повреждения нервной ткани у крыс в динамике хронической интоксикации карбофосом. Данные, представленные в табл. 1, указывают на эндотелиальную дисфункцию у крыс при длительном введении карбофоса.

Ключевым маркером функционального состояния эндотелия является NO, уровень которого на 60-е и 90-е сутки прогрессивно уменьшался на 29 и 34,55 % соответственно, что может быть связа-

Таблица 1. Динамика содержания эндотелина-1, стабильных метаболитов NO, нитротирозина, ЦДЭ и нейронспецифических маркеров повреждения ткани мозга в сыворотке крови крыс при хронической интоксикации карбофосом

Table 1. Dynamics of endothelin-1, stable metabolites of nitric oxide, nitrotyrosine, circulating desquamated endotheliocytes, and neuron-specific markers of brain tissue damage in blood serum of rats with chronic malathion intoxication

Показатель, содержание	Интактные животные	Группа 2			
		30-е сутки	60-е сутки	90-е сутки	120-е сутки
NO, мкмоль/л	38,5 [30,8; 43,2]	42,2 [34,5; 49,8] $p_k = 0,128$	27,4 [23,8; 32,5] $p_k = 0,045$ $p_{30} = 0,0082$	25,2 [16,7; 29,1] $p_k = 0,013$ $p_{30} = 0,0051$ $p_{60} = 0,47$	34,5 [25,2; 38,1] $p_k = 0,297$ $p_{30} = 0,0655$ $p_{60} = 0,23$ $p_{90} = 0,13$
Эндотелин-1, фмоль/мл	6,5 [5,1; 7,7]	7,5 [6,8; 8,7] $p_k = 0,23$	8,2 [7,2; 9,2] $p_k = 0,066$ $p_{30} = 0,42$	10,35 [9,5; 11,1] $p_k = 0,005$ $p_{30} = 0,005$ $p_{60} = 0,03$	8,6 [8,3; 9,6] $p_k = 0,013$ $p_{30} = 0,15$ $p_{60} = 0,34$ $p_{90} = 0,09$
ЦДЭ, $\times 10^4$ /л	5,87 [0; 8,8]	8,8 [4,4; 13,2] $p_k = 0,41$	13,2 [8,8; 17,6] $p_k = 0,034$ $p_{30} = 0,22$	17,6 [17,6; 22,0] $p_k = 0,008$ $p_{30} = 0,02$ $p_{60} = 0,14$	11,0 [8,8; 17,6] $p_k = 0,05004$ $p_{30} = 0,37$ $p_{60} = 0,8$ $p_{90} = 0,06$
Нитротирозин, нмоль/л	5,0 [3,6; 6,1]	5,55 [4,1; 6,1] $p_k = 0,87$	7,4 [6,2; 8,3] $p_k = 0,03$ $p_{30} = 0,03$	11,9 [10,6; 12,4] $p_k = 0,005$ $p_{30} = 0,005$ $p_{60} = 0,005$	7,5 [6,6; 8,7] $p_k = 0,02$ $p_{30} = 0,024$ $p_{60} = 0,69$ $p_{90} = 0,005$
НСЕ, нг/мл	0,975 [0,68; 1,15]	1,065 [0,8; 1,2] $p_k = 0,47$	1,04 [0,7; 1,2] $p_k = 0,87$ $p_{30} = 0,8$	1,61 [1,26; 1,82] $p_k = 0,016$ $p_{30} = 0,03$ $p_{60} = 0,02$	1,225 [0,98; 1,4] $p_k = 0,13$ $p_{30} = 0,23$ $p_{60} = 0,26$ $p_{90} = 0,09$
Белок S-100, нг/мл	1,125 [1,05; 1,35]	1,265 [1,15; 1,6] $p_k = 0,34$	1,92 [1,58; 2,15] $p_k = 0,005$ $p_{30} = 0,03$	2,35 [2,15; 2,45] $p_k = 0,005$ $p_{30} = 0,005$ $p_{60} = 0,1$	1,6 [1,37; 1,8] $p_k = 0,02$ $p_{30} = 0,13$ $p_{60} = 0,15$ $p_{90} = 0,01$

Примечание. Обозначены уровни значимости нулевой статистической гипотезы по сравнению с величиной соответствующего показателя: p_k – животные группы 1 (интактные), p_{30} – на 30-е сутки, p_{60} – на 60-е сутки, p_{90} – на 90-е сутки.

но как с нарушением его продукции, так и с инактивацией образующегося NO. Нами также установлено повышение содержания нитротирозина, который является конечным продуктом окисления пероксинитрита при его взаимодействии с тирозиновыми остатками белков. Пероксинитрит способствует окислению тетрагидробиоптерина, недостаток которого вызывает дефицит активного гомодимера эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), вследствие чего снижается выработка

NO эндотелием [16, 17]. Уровень нитротирозина увеличивался к 60-м и 90-м суткам на 48 и 138 % соответственно по сравнению с контролем (см. табл. 1), что свидетельствует о развивающемся нитрозирующем стрессе.

Другим важным показателем, позволяющим оценить состояние эндотелия, является уровень эндотелина-1, который по мере нарастания хронической интоксикации карбофосом прогрессивно возрастал, достигая к 90-м суткам 159,2 % по

сравнению с животными контрольной группы (см. табл. 1). Учитывая, что полупериод жизни эндотелина-1 составляет 10–20 минут, стойкое увеличение его содержания на 90-е сутки указывает на повреждение эндотелия [18]. Наличие высокого уровня эндотелина-1 на 120-е сутки свидетельствует о сохранении эндотелиальной дисфункции после прекращения действия токсиканта. Не менее важным показателем для оценки состояния эндотелия сосудов, в частности его повреждения, является количество циркулирующих клеток эндотелия, свидетельствующее о его десквамации. Число ЦДЭ у крыс группы 2 на 60-е сутки хронической интоксикации карбофосом увеличивается на 57,14 %, а на 90-е сутки – на 142,86 % (см. табл. 1). В эти же сроки у крыс регистрируется сопряженное возрастание концентрации эндотелина-1 и нитротирозина. Количество ЦДЭ – один из самых объективных морфологических показателей поражения эндотелия сосудов, который свидетельствует об активации апоптоза или развития некротических процессов в эндотелии [2]. Таким образом, полученные данные отражают прогрессирующий характер морфологического и функционального поражения эндотелия.

Эндотелиальная дисфункция является системным патологическим процессом, который вовлекает сосудистую стенку различных органов, в том числе головного мозга [19]. Эндотелиальные клетки сосудов головного мозга являются внутренней частью ГЭБ. Непрерывность эндотелиальной выстилки обеспечивается благодаря плотной связи клеток эндотелия с астроцитами. Для оценки интенсивности протекания деструк-

тивных изменений в нейронах головного мозга и проницаемости ГЭБ исследовали в динамике уровень НСЕ и белка S-100. Установлено, что на 60-е сутки введения карбофоса отмечается значительное возрастание концентрации белка S-100, превысившей показатели интактных крыс на 70,67 % (см. табл. 1), при этом содержание НСЕ не изменялось. Поскольку НСЕ является маркером всех дифференцированных нейронов, ее уровень свидетельствует о степени их повреждения. Повышение концентрации белка S-100 наблюдается при повреждении астроцитарной глии и свидетельствует об увеличении проницаемости ГЭБ [4]. Таким образом, на 60-е сутки на фоне усиления эндотелиальной дисфункции в первую очередь страдали астроглиальные клетки мозга, а нейроны оставались относительно сохранными (без повреждения нейронов даже при повышенной проницаемости ГЭБ уровень НСЕ остается в пределах референтных значений). На 90-е сутки на фоне усиления эндотелиальной дисфункции произошло резкое повышение уровня НСЕ (на 65,13 % по сравнению с интактными животными), концентрация белка S-100 увеличилась на 108,9 % (см. табл. 1). Таким образом, процессы повреждения усилились без четкого преобладания дегенерации определенного вида клеток. Следует отметить сохранение высокого уровня белка S-100 на 120-е сутки в постинтоксикационном периоде, что свидетельствует о хронически протекающем нейродегенеративном процессе в веществе мозга и значительном увеличении проницаемости ГЭБ.

Таблица 2. Корреляция уровня эндотелина-1, стабильных метаболитов NO, нитротирозина, ЦДЭ с концентрацией НСЕ и белка S-100 у крыс при хронической интоксикации карбофосом (*r*; *p*)

Table 2. Correlation of the level of endothelin-1, stable metabolites of nitric oxide, nitrotyrosine, circulating desquamated endotheliocytes with plasma concentrations of neuron-specific enolase and S-100 protein in rats with chronic malathion intoxication (*r*; *p*)

Показатель	Связь с уровнем НСЕ и белка S-100							
	30-е сутки		60-е сутки		90-е сутки		120-е сутки	
	Содержание НСЕ	Содержание белка S-100	Содержание НСЕ	Содержание белка S-100	Содержание НСЕ	Содержание белка S-100	Содержание НСЕ	Содержание белка S-100
Содержание NO	-0,58; 0,22	-0,14; 0,79	0,31; 0,54	-0,31; 0,53	0,2; 0,7	-0,2; 0,69	0,32; 0,53	0,31; 0,54
Содержание эндотелина-1	0,58; 0,23	0,14; 0,79	-0,6; 0,21	0,83; 0,04	0,82; 0,04	0,82; 0,04	0,65; 0,15	0,66; 0,16
Количество ЦДЭ	0,76; 0,08	0,44; 0,38	0,23; 0,66	0,67; 0,14	0,64; 0,17	0,81; 0,04	0,63; 0,13	0,63; 0,17
Содержание нитротирозина	0,81; 0,05	0,60; 0,21	0,83; 0,041	0,89; 0,02	0,71; 0,11	0,83; 0,04	0,89; 0,02	0,89; 0,02

При исследовании взаимосвязи между эндотелиальной дисфункцией и активностью нейродегенеративных процессов (табл. 2) установлена тесная корреляция между содержанием эндотелина-1 и белка S-100 на 60-е сутки хронической интоксикации карбофосом, что, по-видимому, подтверждает наличие связи между повреждением эндотелия, нарушением ГЭБ и дегенерацией астроцитарной глии в начальный период интоксикации. На 90-е сутки наблюдалась статистически значимая связь концентрации эндотелина-1 и ЦДЭ с уровнем белка S-100, а также содержания эндотелина-1 и НСЕ, что говорит о присоединении прогрессирующей дегенерации нейронов.

Значительная зависимость между уровнем нитротирозина и нейронспецифических белков на 90-е сутки свидетельствует о важной роли нитрозирующего стресса в повреждении ГЭБ.

На втором этапе оценили эффективность комплексного соединения 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой (ОМУ-ЯК), препарата L-аргинина и НИЛИ в коррекции возникших изменений в состоянии эндотелия на 90-е сутки хронической интоксикации карбофосом и в отдаленном постинтоксикационном периоде (табл. 3). Эндотелин-1 в высоких концентрациях помимо vasoактивного действия увеличивает проницаемость ГЭБ, активизирует астроциты, усиливает

Таблица 3. Содержание эндотелина-1, стабильных метаболитов NO, нитротирозина, ЦДЭ и нейронспецифических маркеров повреждения ткани мозга в сыворотке крови крыс при хронической интоксикации карбофосом на фоне терапии ОМУ-ЯК, НИЛИ и препаратом L-аргинина

Table 3. The content of endothelin-1, stable metabolites of nitric oxide, nitrotyrosine, circulating desquamated endotheliocytes and neuron-specific markers of brain tissue damage in blood serum in rats with chronic malathion intoxication during therapy with a complex compound of 5-hydroxy-6-methyluracil with succinic acid, low-intensity laser radiation and L-arginine preparation

Показатель, содержание	Интактные животные	Группа животных	Этап исследования	
			90-е сутки	120-е сутки
NO, мкмоль/л	38,5 [30,8; 43,2]	2	25,2 [16,7; 29,1]	34,5 [25,2; 38,1]
		3	26,0 [25,1; 28,0] *	32,0 [26,2; 37,5]
		4	27,8 [26,8; 32,5] *	34,8 [29,6; 40,8]
		5	32,8 [28,8; 36,1] #	35,0 [32,6; 38,8]
		6	34,85 [28,7; 41,7] #	35,65 [31,7; 40,7]
		Эндотелин-1, фмоль/мл	6,5 [5,1; 7,7]	2
		3	9,65 [8,7; 10,2] *	8,8 [7,7; 9,7] *
		4	7,35 [6,7; 9,1] #	7,95 [7,2; 8,4]
		5	7,9 [7,4; 9,5] #	7,85 [6,4; 8,7]
		6	7,0 [6,6; 8,6] #	8,8 [7,7; 9,7] #
ЦДЭ, × 10 ⁴ /л	5,9 [0,0; 8,8]	2	17,6 [17,6; 22,0]	11,0 [8,8; 17,6]
		3	19,8 [17,6; 22,0] *	13,2 [8,8; 17,6] *
		4	13,2 [8,8; 17,6] *	11,0 [4,4; 13,2]
		5	15,4 [13,2; 17,6] **	11,0 [8,8; 13,2]
		6	8,8 [8,8; 13,2] #	6,6 [4,4; 13,2]
		Нитротирозин, нмоль/л	5,0 [3,6; 6,1]	2
3	9,8 [8,2; 11,1] **			7,0 [5,7; 8,5]
4	7,8 [6,4; 9,0] *##			7,0 [5,1; 7,6]
5	7,0 [5,6; 8,3] ##			6,2 [4,6; 7,1]
6	5,5 [4,1; 6,8] ##			5,2 [3,9; 5,7] ^
НСЕ, нг/мл	0,98 [0,68; 1,15]			2
		3	1,44 [1,38; 1,57] **	1,27 [1,1; 1,37]
		4	0,95 [0,80; 1,25] #	1,08 [0,85; 1,15]
		5	1,13 [0,95; 1,35] #	0,98 [0,80; 1,20]
		6	0,99 [0,73; 1,22] #	0,92 [0,72; 1,08]
		Белок S-100, нг/мл	1,12 [1,05; 1,35]	2
3	2,18 [2,05; 2,30] **			1,45 [1,25; 1,90]
4	1,77 [1,32; 2,05] *#			1,44 [1,05; 1,90]
5	1,79 [1,41; 1,95] *			1,32 [1,15; 1,50]
6	1,42 [1,25; 2,10] #			1,14 [1,05; 1,55]

Примечание. Обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей животных группы 1 (интактных) (* – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$) и группы 2 (карбофос) (# – при $p < 0,05$, ## – при $p < 0,01$).

экспрессию молекул клеточной адгезии [20]. На фоне применения НИЛИ и ОМУ-ЯК уровень эндотелина-1 у крыс снижался на 23,67 и 29 % соответственно в сравнении с группой 2. У крыс группы 6, получавших комбинированную терапию, уровни эндотелина-1 и ЦДЭ приближались к показателям интактных животных.

НИЛИ повышало содержание NO на 30,15 % в сравнении с группой 2, при применении комбинированной терапии уровень NO увеличивался на 38,3 % (см. табл. 3). Важным механизмом снижения продукции NO является активация свободнорадикального окисления и образования супероксидного анион-радикала, который, взаимодействуя с NO, образует пероксинитрит. Гиперпродукция пероксинитрита уменьшает транспорт L-аргинина в эндотелиальные клетки, синтез и биодоступность NO [21]. ОМУ-ЯК снижает образование супероксидного анион-радикала, который способен подавлять активность eNOS. На модели дисфункции эндотелия, вызванной введением ингибитора NO L-NAME, установлена способность ОМУ-ЯК оказывать эндотелиопротекторное действие [11]. НИЛИ, нормализуя нарушенный редокс-баланс, предотвращает разобщение eNOS и повышает ее активность [22, 23]. Маркером выработки пероксинитрита является уровень нитротирозина. Применение НИЛИ, ОМУ-ЯК снизило его на 41,6 и 34,88 % соответственно в сравнении с животными группы 2 (см. табл. 3). Наиболее выраженный результат отмечался при применении комбинированной терапии, при которой содержание нитротирозина в плазме крови снизилось на 53,8 % и практически не отличалось от значения интактных животных.

Применение препарата L-аргинина у крыс группы 3 оказалось практически неэффективным. Известно, что при высоком уровне асимметричного диметиларгинина, который подавляет eNOS, введение L-аргинина восстанавливает ее активность. NO-синтазы обладают высоким сродством к L-аргинину и редко имеют недостаток в субстрате, так как только 4 % эндогенного аргинина используется для синтеза NO [24]. Эффективность L-аргинина в значительной степени связана с его способностью проникать в эндотелиальные клетки, которая зависит от активности мембранно-связанной транспортной системы. Полученные результаты наибольшей эффективности комбинированной терапии у крыс группы 6 при хронической интоксикации карбофосом можно объяснить способностью НИЛИ и комплексного соединения ОМУ-ЯК купировать окислительный и нитрозирующий стресс, тем самым улучшая структурно-функциональное состояние эндотелиальных клеток, что облегчает транспорт

L-аргинина и его доступность для eNOS. Таким образом, применение данных способов коррекции при хронической интоксикации карбофосом оказало благоприятное влияние на функциональное и морфологическое состояние эндотелия. Следует отметить сохранение эндотелиопротективного эффекта в отдаленном постинтоксикационном периоде на 120-е сутки.

Оценивая данные, полученные в ходе изучения содержания в сыворотке крови белка S-100 и HSE, на 90-е сутки хронической интоксикации карбофосом у животных, получавших комплексное соединение ОМУ-ЯК, снижалось содержание белка S-100 и HSE на 24,68 и 41,0 % соответственно; на фоне применения НИЛИ уровень HSE уменьшался на 29,82 % (см. табл. 3). По способности снижать гиперпротеинемию S-100 и HSE комбинированная терапия (крысы группы 6) оказалась наиболее эффективной, так как уровень исследуемых маркеров приближался к показателям интактных животных. Таким образом, полученные данные являются свидетельством того, что НИЛИ, ОМУ-ЯК, а также их комбинация с препаратом L-аргинина, примененные в качестве коррекции у крыс на фоне хронической интоксикации карбофосом, уменьшают выраженность эндотелиальной дисфункции и тем самым способствуют стабилизации ГЭБ, снижая активность нейродегенеративных процессов.

Заключение

Хроническая интоксикация карбофосом сопровождается ЭД и нейродегенерацией, выраженность которых уменьшает комбинированное применение НИЛИ, ОМУ-ЯК и L-аргинина.

Список литературы / References

1. Badr A.M. Organophosphate toxicity: updates of malathion potential toxic effects in mammals and potential treatments. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2020;27(21):26036–26057. doi: 10.1007/s11356-020-08937-4
2. Васина Л.В., Петрищев Н.Н., Власов Т.Д. Эндотелиальная дисфункция и ее основные маркеры. *Регионар. кровообращ. и микроциркуляция.* 2017; 16(1):4–15.
3. Vasina L.V., Petrishchev N.N., Vlasov T.D. Markers of endothelial dysfunction. *Regionarnoye krovoobrashcheniye i mikrotsirkulyatsiya = Regional Blood Circulation and Microcirculation.* 2017;16(1):4–15. [In Russian].
3. Быков Ю.В., Батурич В.А. Нейроспецифические белки как маркеры повреждения головного мозга при сахарном диабете. *Вестн.*

Смол. гос. мед. акад. 2023;22(4):36–42. doi: 10.37903/vsgma.2023.4.5

Vykov Yu.V., Baturin V.A. Neuron-specific proteins as markers of brain damage in diabetes mellitus. *Vestnik Smolenskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii = Vestnik of the Smolensk State Medical Academy*. 2023;22(4):36–42. [In Russian]. doi: 10.37903/vsgma.2023.4.5

4. Levchuk L.A., Bokhan N.A., Ivanova S.A. Neurospecific proteins as transdiagnostic markers of affective disorders. *Neurochemical Journal*. 2023;17(1):25–29. doi: 10.1134/s1819712423010117

5. dos Santos A.A., Naime A.A., de Oliveira J., Colle D., dos Santos D.B., Hort M.A., Moreira E.L., Suñol C., de Bem A.F., Farina M. Long-term and low-dose malathion exposure causes cognitive impairment in adult mice: evidence of hippocampal mitochondrial dysfunction, astrogliosis and apoptotic events. *Arch. Toxicol.* 2015;90(3):647–660. doi: 10.1007/s00204-015-1466-0

6. Dorri S.A., Hosseinzadeh H., Abnous K., Hasani F.V., Robati R.Y., Razavi B.M. Involvement of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on malathion induced depressive-like behavior in subacute exposure and protective effects of crocin. *Iran. J. Basic. Med. Sci.* 2015;18(10):958–966.

7. Lan A., Stein D., Portillo M., Toiber D., Kofman O. Impaired innate and conditioned social behavior in adult C57Bl6/J mice prenatally exposed to chlorpyrifos. *Behav. Brain. Funct.* 2019;15(1):2. doi: 10.1186/s12993-019-0153-3

8. Срубиллин Д.В., Срубиллин А.Д., Гадельшина Г.Ф., Еникеев Д.А. Влияние хронической интоксикации карбофосом на поведенческие реакции у крыс с различным индивидуально-типологическим поведенческим статусом. *Соврем. пробл. науки и образ.* 2022;(5):128. doi: 10.17513/spno.32143

Srubilin D.V., Srubilin A.D., Gadel'shina G.F., Enikeev D.A. The effect of chronic intoxication with carbophosom on behavioral reactions in rats with different individual-typological behavioral status. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*. 2022;(5):128. [In Russian]. doi: 10.17513/spno.32143

9. Berroug L., Laaroussi M., Essaidi O., Malqui H., Anarghou H., Chaoui A.A., Najimi M., Chigr F. Sex-specific neurobehavioral and biochemical effects of developmental exposure to Malathion in offspring mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2024;397(4):2215–2231. doi: 10.1007/s00210-023-02749-2

10. Franco C., Sciatti E., Favero G., Bonomini F., Vizzardi E., Rezzani R. Essential hypertension and oxidative stress: novel future perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(22):14489. doi: 10.3390/ijms232214489

11. Срубиллин Д.В., Еникеев Д.А., Мышкин В.А., Гимадиева А.Р. Механизмы нарушения функции

эндотелия у крыс при хронической интоксикации дихлорэтаном и возможности коррекции комплексным соединением 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой. *Соврем. пробл. науки и образ.* 2017;(5):68.

Srubilin D.V., Enikeev D.A., Myshkin V.A., Gimadieva A.R. Mechanisms of endothelial dysfunction in rats with chronic dichloroethane intoxication and the possibility of correction by a complex compound of 5-hydroxy-6-methyluracil with succinic acid. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*. 2017;(5):68. [In Russian].

12. Colombo E., Signore A., Aicardi S., Zekiy A., Utyuzh A., Benedicenti S., Amaroli A. Experimental and clinical applications of red and near-infrared photobiomodulation on endothelial dysfunction: a review. *Biomedicines*. 2021;9(3):274. doi: 10.3390/biomedicines9030274

13. Москвин С.В., Кочетков А.В., Асхадуллин Е.В., Митьковский В.Г. Лазерная терапия при COVID-19: профилактика, лечение, реабилитация. Тверь: «Триада», 2021. 136 с.

Moskvin S.V., Kochetkov A.V., Askhadullin E.V., Mit'kovskii V.G. Laser therapy for COVID-19: prevention, treatment, rehabilitation. Tver: «Triada», 2021. 136 p. [In Russian].

14. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови. *Клин. лаб. диагност.* 2005;(6):15–18.

Metel'skaya V.A., Gumanova N.G. Screening is a method for determining the level of nitric oxide metabolites in blood serum. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2005;(6):15–18. [In Russian].

15. Петрищев Н.Н., Беркович О.А., Власов Т.Д., Волкова Е.В., Зуева Е.Е., Мозговая Е.В. Диагностическая ценность определения десквамированных эндотелиальных клеток в крови. *Клин. лаб. диагност.* 2001;(1):50–52.

Petrishchev N.N., Berkovich O.A., Vlasov T.D., Volkova E.V., Zuyeva E.E., Mozgovaya E.V. The diagnostic value of determining desquamated endothelial cells in the blood. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2001;(1):50–52. [In Russian].

16. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Короткова Н.В., Мжаванадзе Н.Д. Изучение молекулярных механизмов эндотелиальной дисфункции *in vitro*. *Гены и клетки*. 2019;14(1):22–32. doi: 10.23868/201903003

Kalinin R.E., Suchkov I.A., Korotkova N.V., Mzhavanadze N.D. The research of the molecular mechanisms of endothelial dysfunction *in vitro*. *Geny i kletki = Genes and Cells*. 2019;14(1):22–32. [In Russian]. doi: 10.23868/201903003

17. Mohd Ariff A., Abu Bakar N.A., Abd. Muid S., Omar E., Ismail N.H., Ali A.M., Mohd Kasim N.A., Mohd Nawawi H. *Ficus deltoidea* suppresses endothelial activation, inflammation, monocytes adhesion and oxidative stress via NF- κ B and eNOS pathways in stimulated human coronary artery endothelial cells. *BMC Complement. Med. Ther.* 2020;20(56):1–13. doi: 10.1186/s12906-020-2844-6
18. Jankowich M., Choudhary G. Endothelin-1 levels and cardiovascular events. *Trends Cardiovasc. Med.* 2020;30(1):1–8. doi: 10.1016/j.tcm.2019.01.007
19. Хорева М.А. Исследование дисфункции эндотелия у пациентов с хронической ишемией головного мозга. *Фундам. аспекты психич. здоровья.* 2018;(1):15–20.
- Khoreva M.A. Investigation of endothelial dysfunction in patients with chronic cerebral ischemia. *Fundamental'nye aspekty psikhicheskogo zdorov'ya = fundamental aspects of mental health.* 2018;(1):15–20. [In Russian].
20. Freeman B.D., Martins Y.C., Akide-Ndunge O.B., Bruno F.P., Wang H., Tanowitz H.B., Spray D.C., Desruisseaux M.S. Endothelin-1 mediates brain microvascular dysfunction leading to long-term cognitive impairment in a model of experimental cerebral malaria. *PLoS Pathog.* 2016;12(3):e1005477. doi: 10.1371/journal.ppat.1005477
21. Venardos K., Zhang W.Z., Langa C., Kaye D.M. Effect of peroxynitrite on endothelial L-arginine transport and metabolism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2009;41(12):2522–2527. doi: 10.1016/j.biocel.2009.08.008
22. Москвин С.В., Кочетков А.В., Бурдули Н.М., Асхадуллин Е.В. Обоснование применения лазерной терапии для предотвращения развития эндотелиальной дисфункции у больных COVID-19. *Вестн. нов. мед. технол.* 2020;14(5):145–154. doi: 10.24411/2075-4094-2020-16713
- Moskvin S.V., Kochetkov A.V., Burduli N.M., Askhadullin E.V. The justification of the use of low-level laser therapy to prevent the development of endothelial dysfunction in COVID-19 patients. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Journal of New Medical Technologies.* 2020;14(5):145–154. [In Russian]. doi: 10.24411/2075-4094-2020-16713
23. Yokomizo S., Atochin D.N., Kashiwagi S. Near-infrared II photobiomodulation augments nitric oxide bioavailability via phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Biophotonics and Immune Responses XVIII: proc. conf., 2023, March 14; US San Francisco; 2023; 12380: 1238007.* doi: 10.1117/12.2646735
24. Wu G., Meininger C.J., McNeal C.J., Bazer F.W., Rhoads J.M. Role of L-arginine in nitric oxide synthesis and health in humans. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2021;1332:167–187. doi: 10.1007/978-3-030-74180-8_10

Сведения об авторах:

Срубиллин Дмитрий Витальевич, к.м.н., ORCID: 0000-0001-7990-8561, e-mail: srubilin66@mail.ru
Исакова Маргарита Александровна, к.м.н., ORCID: 0009-0002-8757-3524, e-mail: srubilina@mail.ru
Срубиллин Андрей Дмитриевич, ORCID: 0009-0001-4060-4074, e-mail: srubilin@mail.ru
Еникеев Дамир Ахметович, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0001-6270-583X, e-mail: enikeyev@mail.ru
Игнатова Маргарита Константиновна, ORCID: 0009-0002-3226-6690, e-mail: mignatova999@mail.ru

Information about the authors:

Dmitrii V. Srubilin, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0001-7990-8561, e-mail: srubilin66@mail.ru
Margarita A. Isakova, candidate of medical sciences, ORCID: 0009-0002-8757-3524, e-mail: srubilina@mail.ru
Andrei D. Srubilin, ORCID: 0009-0001-4060-4074, e-mail: srubilin@mail.ru
Damir A. Enikeev, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0001-6270-583X, e-mail: enikeyev@mail.ru
Margarita K. Ignatova, ORCID: 0009-0002-3226-6690, e-mail: mignatova999@mail.ru

Поступила в редакцию 07.05.2025
После доработки 05.08.2025
После повторной доработки 18.09.2025
Принята к публикации 20.09.2025

Received 07.05.2025
Revision received 05.08.2025
Second revision received 18.09.2025
Accepted 20.09.2025