

ИЗУЧЕНИЕ ВАЗОДИЛАТИРУЮЩЕЙ И АНТИТРОМБОТИЧЕСКОЙ ФУНКЦИЙ ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС НА РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЯХ ЕГО ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

Воронков А.В., Поздняков Д.И., Мамлеев А.В.

Пятигорский медико-фармацевтический институт-филиал ГБОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет, Пятигорск, Россия (357532, Пятигорск, пр. Калинина 11), pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Изучена вазодилатирующая и антитромботическая функция эндотелия сосудов головного мозга на различных моделях его ишемического повреждения. Экспериментальную ишемию головного мозга крыс вызывали путем: окклюзии правой средней мозговой артерии, билатеральной и ипсилатеральной окклюзии общих сонных артерий, ишемией – реперфузией. Вазодилатирующую функцию эндотелия оценивали с помощью метода доплерографии (с помощью ультразвукового доплерографа) при модификации синтеза эндогенного оксида азота. Антитромботическая функция эндотелия оценивалась по способности тромбоцитов к агрегации (с помощью двухканального лазерного анализатора агрегации тромбоцитов АЛАТ – 2 «БИОЛА»). В результате исследования установлено, что все воспроизведенные модели ишемии головного мозга приводят к нарушению вазодилатационной и антитромботической функций эндотелия. При этом в результате окклюзии правой средней мозговой артерии, относительно других реализованных в работе моделей, наблюдается более выраженное угнетение вазодилатирующей функции, а при билатеральной окклюзии общих сонных артерий – антитромботической функции эндотелия сосудов головного мозга крыс, ВТО время как при ипсилатеральной окклюзии правой общей сонной артерии и ишемии – реперфузии изучаемые функции эндотелия изменялись практически одинаково.

Ключевые слова: ишемия головного мозга, эндотелиальная дисфункция, вазодилатация, агрегация тромбоцитов.

THE STUDY OF THE VASODILATING AND ANTITHROMBOTIC FUNCTION OF THE ENDOTHELIUM OF BRAIN VESSELS OF RATS IN VARIOUS MODELS OF ISCHEMIC INJURY

Voronkov A.V., Pozdnyakov D.I., Mamleev A.V.

Pyatigorsk medical-pharmaceutical Institute-branch of Volgograd state medical University, Pyatigorsk, Russia (357532, Pyatigorsk, Kalinin Ave. 11), pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Antithrombotic and vasodilator function of vascular endothelium of the brain was studied in different models of its ischemic damage. Experimental brain ischemia induced in rats by occlusion of the right middle cerebral artery and ipsilateral occlusion of the bilateral common carotid artery, ischemia - reperfusion. Vasodilating endothelial function was evaluated by Doppler by modification of the endogenous synthesis of nitric oxide (using Doppler ultrasound). Antithrombotic endothelial function was assessed by the ability of platelets to aggregate (using two-channel laser analyzer platelet aggregation ALAT - 2 "Biola"). The study found that all reproduction model of brain ischemia lead to a breach of vasodilatory and antithrombotic endothelial function. At the same time as a result of occlusion of the right middle cerebral artery, relative to other models implemented in the work, there is a more pronounced inhibition of vasodilator function, and with bilateral occlusion of the common carotid arteries - vascular endothelial antithrombotic function of rat brain, while at the ipsilateral occlusion of the right common carotid artery and ischemia - reperfusion studied endothelial function changed almost identically.

Keywords: cerebral ischemia, endothelial dysfunction, vasodilatation, platelet aggregation.

На сегодняшний день нарушения мозгового кровообращения, в частности ишемический инсульт, являются одной из ведущих причин, приводящих к смерти человека либо его инвалидности [1]. Высокая частота смертности и первичной инвалидности от данной цереброваскулярной патологии связана с многофакторным повреждающим

действием на головной мозг. Среди этих факторов не последнюю роль играет дисфункция эндотелия сосудов [2,7], что открывает перспективное направление фармакологической коррекции ишемического инсульта, а именно – целенаправленное терапевтическое воздействие на эндотелиоциты мозговых сосудов. Однако функциональное состояние эндотелия (его вазодилатационная функция и антитромботический потенциал) при нарушениях мозгового кровообращения ишемического генеза изучены недостаточно [2], что и предопределило цель настоящего исследования.

Цель исследования. Целью данной работы являлось экспериментальное изучение вазодилатирующей и антитромботической функций эндотелия сосудов головного мозга крыс на различных моделях его ишемического повреждения.

Материалы и методы. Исследование реализовано на 60 крысах-самцах линии Wistar, разделенных на 5 равных экспериментальных групп, по 12 особей. Первая группа – интактные животные (ИЖ). Ишемическое повреждение головного мозга воспроизводили у наркотизированных хлоралгидратом (350 мг/кг) животных на четырех моделях: правосторонняя окклюзия средней мозговой артерии (ПОСМА), с трехдневным периодом ишемии, восьмичасовая билатеральная окклюзия общих сонных артерий (БОСА), четырехдневная ипсилатеральная окклюзия правой общей сонной артерии (ПОСА), ишемия – реперфузия (ИР), с пятиминутным периодом ишемии [3,6]. По истечении указанного времени проводили оценку вазодилатирующей и антитромботической функций эндотелия сосудов головного мозга крыс.

Вазодилатирующую функцию оценивали путем измерения скорости мозгового кровотока (средней систолической скорости – С_к) в проекции правой средней мозговой артерии, при модификации синтеза эндогенного оксида азота. Скорость мозгового кровотока регистрировали с помощью ультразвукового доплерографа, датчика УЗОП-010-01 с рабочей частотой 25МГц и компьютерной программы ММ-Д-К-MinimaxDoppler v.1.7. (Санкт-Петербург, Россия). Модификацию синтеза эндогенного NO осуществляли введением тест – систем: ацетилхолин (АЦХ) 0,1 мг/кг (Sigma-Aldrich), L-аргинин 150 мг/кг (Panreac), нитро-L—аргинин метиловый эфир (L- NAME) 15 мг/кг (Sigma-Aldrich) в левую бедренную вену.

Антитромботическую функцию эндотелия оценивали по способности тромбоцитов к агрегации. Процесс агрегации тромбоцитов регистрировали с помощью двухканального лазерного анализатора агрегации тромбоцитов АЛАТ – 2 «БИОЛА» (НПФ «БИОЛА», Россия), методом определения относительного среднего размера агрегатов. В качестве индуктора агрегации использовали АДФ (НПО «Ренам») в конечной концентрации 5мкМ. При этом определяли степень (СтАТ) и скорость агрегации (СкАТ) тромбоцитов.

Результаты опытов обрабатывали методом вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., США для операционной системы Windows). Вычисляли среднее значение и стандартную ошибку среднего значения. Полученные данные проверяли на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро – Уилка. В случае нормального распределения данных для сравнения средних использовали t-критерий Стьюдента. При ненормальном распределении результатов эксперимента дальнейшую статистическую обработку данных проводили с использованием U- критерия Манна – Уитни.

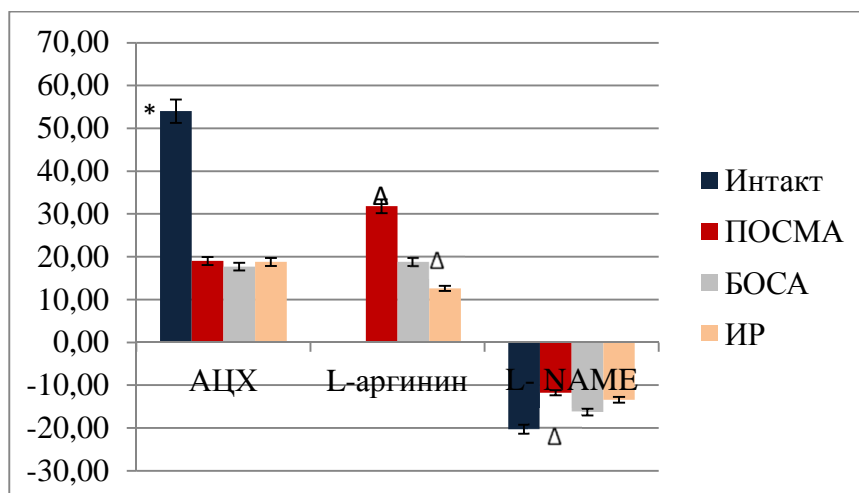
Результаты и обсуждение

Исходная скорость локального мозгового кровотока у интактных животных составляла, $4,59 \pm 0,44$ см/сек. Внутривенное введение АЦХ крысам данной группы привело к увеличению S_k на 54 % ($p > 0,01$), в то время как введение L-аргинина не оказало значимого влияния на уровень мозгового кровотока (Рис.1). Блокада системы синтеза оксида азота посредством внутривенного введения L-NAME вызвало снижение S_k на 20,3 % ($p > 0,05$). Полученные данные согласуются с литературными источниками [4,7].

В результате окклюзии правой средней мозговой артерии скорость кровотока падает в 1,9 ($p > 0,05$) раза, до значения $2,398 \pm 0,22$ см/сек. Стимулированный ацетилхолином выброс оксида азота вызвал у данной группы крыс значительно меньший, чем у интактных животных, сосудистый ответ (скорость локального мозгового кровотока увеличилась лишь на 19 %). В то же время внутривенное введение крысам с ПОСМА L-аргинина – субстрата синтеза оксида азота привело к увеличению S_k на 31,8 % ($p > 0,05$), что, по всей видимости, может свидетельствовать о развитии феномена «L – аргининового парадокса», который в свою очередь является одним из маркеров эндотелиальной дисфункции [7]. При введении L-NAME у данной группы животных S_k снизилась только на 11,8 % от ее исходного уровня, что, вероятно, объясняется меньшей, чем у ИЖ, активностью ферментных систем, ответственных за синтез NO [4]. В совокупности, полученные данные позволяют предположить, что в условиях ПОСМА наблюдается нарушение вазодилатационной функции эндотелиоцитов сосудов головного мозга крыс.

У животных с билатеральной окклюзией общих сонных артерий скорость мозгового кровотока после оперативного вмешательства составила, $2,264 \pm 0,24$ см/сек. Последующее введение эндотелий-специфичных анализаторов позволило выявить следующую тенденцию. Также как и у животных с ПОСМА у данных крыс наблюдается сниженная (по сравнению с ИЖ) сосудистая реакция в ответ на введение АЦХ (прирост кровотока от его первоначальных значений составил 17,7 %). Однако реакция сосудов на введение L-аргинина

носила менее выраженный характер, чем у животных с ПОСМА (Рис. 1). Изменение Ск у животных с БОСА при введении данного анализатора составило +18,8 % ($p>0,05$).



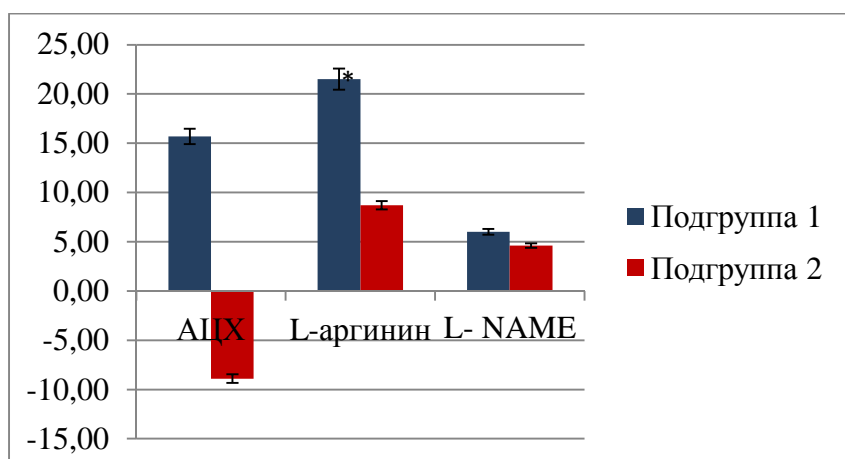
Примечание: * – достоверно относительно исходного значения ($p>0,01$),
 Δ – достоверно относительно исходного значения ($p>0,05$).

Рис.1. Изменение скорости локального мозгового кровотока, у животных с ПОСМА, БОСА и ИР на фоне введения эндотелий-специфичных анализаторов

Внутривенное введение нитро – L-аргинин метилового эфира данной группе животных привело к падению скорости локального мозгового кровотока на 16,3 %, что меньше аналогичного показателя ИЖ в 1,2 раза ($p>0,05$). Полученные результаты позволяют предположить, что экспериментально смоделированная ишемия головного мозга путем билатеральной окклюзии общих сонных артерий приводит к развитию эндотелиальной дисфункции.

У группы крыс с ипсилатеральной окклюзией правой общей сонной артерии исходная скорость кровотока при оценке вазодилатирующей функции эндотелия составляла, $4,164 \pm 0,299$ см/сек. При введении АЦХ у данной группы крыс наблюдалось как увеличение скорости кровотока – на 15,7, % (Рис.2) (подгруппа 1) так и ее уменьшение – на 8,9 % (подгруппа 2), что, по всей видимости, может служить одним из признаков нарушения нормального функционирования эндотелия [5]. На фоне введения L-аргинина прирост скорости кровотока у животных, у которых имела место положительная реакция на АЦХ, составил 21,5 % ($p>0,05$), а у крыс с отрицательной реакцией на введение ацетилхолина – 8,7 %. Внутривенное введение L-NAME крысам с ПОСА в обеих подгруппах животных вызвало повышение Ск на 6 % и 4,6 % (подгруппа 1 и подгруппа 2 соответственно), что вероятно связано с разобщением синтеза оксида азота на уровне ферментных систем [5]. Вариабельность сосудистого ответа на введение АЦХ повышение скорости кровотока в ответ на введение L-аргинина и нитро – L-аргинин метилового эфира дают основание

предполагать, что при ипсилатеральной окклюзии правой общей сонной артерии наблюдается нарушение эндотелий опосредованная продукция вазоактивных соединений.

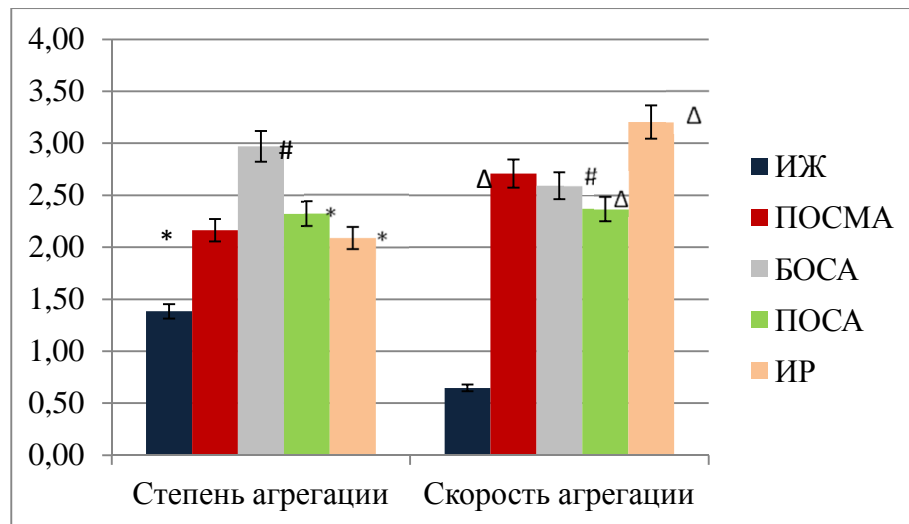


Примечание: * – достоверно относительно исходного значения ($p > 0,05$).

Рис.2. Изменение скорости локального мозгового кровотока, у животных с ПОСА на фоне введения эндотелий-специфичных анализаторов

Первоначальная скорость мозгового кровотока у животных с ишемией - реперфузией головного мозга составляла, $3,886 \pm 0,3$ см/сек. По истечении 5-ти минутного периода ишемии у данной группы животных при восстановлении кровотока наблюдались явления гиперперфузии, и, как следствие этого, Ск увеличилась на 10,1 %. После восстановления уровня мозгового кровотока до его исходных значений, осуществляли оценку вазодилатационной функции эндотелия. При введении ацетилхолина данным животным Ск увеличилась на 18,8 %, также данный показатель увеличился и при введении L-аргинина – на 12,6 %. На фоне L-NAME у животных группы ИР скорость мозгового кровотока снизилась на 13,4 %. Полученные результаты позволяют предположить у крыс после перенесенной 5-ти минутной ишемии с последующей реперфузией развивается нарушение вазомоторной функции эндотелия.

Анализ тромбоцитарного звена гемостаза показал, что при всех воспроизводимых в работе экспериментальных моделях ишемии головного мозга наблюдается повышение, относительно группы интакта, как степени, так и скорости агрегации тромбоцитов (у ИЖ значения данных показателей составляли $1,384 \pm 0,07$ ус. ед и $0,647 \pm 0,125$ ус. ед соответственно) (Рис. 3). В результате правосторонней окклюзии средней мозговой артерии, исследуемые показатели тромбоцитарного гемостаза увеличились соответственно в 1,56 ($p > 0,01$) и 4,2 ($p > 0,001$) раза.



Примечание: * – достоверно относительно интактной группы животных ($p > 0,01$),
 Δ – достоверно относительно интактной группы животных ($p > 0,001$),
 $\#$ – достоверно относительно интактной группы животных ($p > 0,02$).

Рис.3. Изменение показателей процесса агрегации тромбоцитов при различных способах моделирования ишемии головного мозга

У животных с БОСА степень агрегации тромбоцитов увеличилась относительно интактной группы крыс в 2,15 ($p > 0,02$), в то же время рост скорости агрегации тромбоцитов составил 300 % ($p > 0,02$). При ипсилатеральной окклюзии правой общей сонной артерии СтАТ увеличилась в 1,7 ($p > 0,01$) раза, а СкАТ 3,7 ($p > 0,01$) раза. В группе ИР степень и скорость агрегации тромбоцитов увеличились в 1,5 ($p > 0,01$) и 5 ($p > 0,001$) раз соответственно (Рис.3).

Выводы. В результате проведенного исследования установлено, что при всех, реализованных в работе, моделях ишемии головного мозга развивается нарушение вазодилатирующей и антитромботической функций эндотелия сосудов, сопровождаемое снижением вазореактивности к АЦХ и нитро – L-аргинин метилового эфиру, развитием феномена «L – аргининового парадокса», повышением степени и скорости агрегации тромбоцитов. При этом наиболее выраженные изменения вазодилатирующей функции отмечены при окклюзии правой средней мозговой артерии, т.к. при сопоставимых (с другими моделями) значениях скорости мозгового кровотока в ответ на введение ацетилхолина и нитро- L-аргинин метилового эфира, явление «L-аргининового парадокса» носило более выраженный характер (скорость локального мозгового кровотока увеличилась на 31,8 % ($p > 0,05$)). Антитромботическая функция эндотелия претерпела существенные изменения на модели билатеральной окклюзии общих сонных артерий, т.к. при воспроизведении данной методики степень агрегации тромбоцитов была выше ($2,971 \pm 0,465$ ус. ед), чем при остальных вариантах ишемии головного мозга, при сопоставимых значениях скорости агрегации тромбоцитов.

Список литературы

1. Гусев Е. И., Скворцова В. И., Мартынов М. Ю. Церебральный инсульт: проблемы и решения // Вестник РАМН. 2003. № 11. С. 44–48.
2. Суслина З.А., Танашян М.М., Домашенко М.А. Дисфункция эндотелия при ишемических нарушениях мозгового кровообращения // Неврология. 2008. Т.1. № 2. С.4-11.
3. Назарова Л.Е., Дьякова И.Н. Влияние кислоты феруловой на зону некроза, возникающего в результате окклюзии средней мозговой артерии // Медицинский вестник Башкортостана. 2011. № 3. С.133-135.
4. Тюренков И.Н., Поройский С.В., Воронков А.В. Оценка вазодилатирующей функции эндотелия сосудов брюшины на фоне стандартной операционной травмы // Волгоградский научно-медицинский журнал. 2012. №1. С.45-46.
5. Тюренков И.Н., Воронков А.В. Методический подход к оценке эндотелиальной дисфункции в эксперименте // Эксперим. и клинич. фармакология. 2008. Т. 71 (1). С 49–51.
6. Щербак Н.С., Галагудза М.М. Экспериментальные модели ишемического инсульта // Бюллетень федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова. 2011. Июнь. С.39-46.
7. Эндотелиопротекторы – новый класс фармакологических препаратов // И.Н. Тюренков, А.В. Воронков, А.А. Слиецанс и др. // Вестник РАМН. – 2012. – № 7. – С. 50-57.

Рецензенты:

Черников М.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологии и физиологии ГБОУ ВПО Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала Волгоградского государственного медицинского университета, г. Волгоград;

Погорельый В.Е., д.б.н., профессор кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии ГБОУ ВПО Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала Волгоградского государственного медицинского университета, г. Волгоград.