УДК 612.13:616-005.4

ПОСТИШЕМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВАЗОМОТОРНОЙ ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ

Горшкова О.П.[1], Шуваева В.Н.[1], Ленцман М.В.[1], Артемьева А.И.[1]

[1]ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН, Санкт-Петербург, e-mail: o_gorshkova@inbox.ru

Несмотря на наличие большого количества работ, освещающих проблему острой цереброваскулярной ишемии, на сегодняшний день функциональное состояние эндотелия в период после ишемических нарушений мозгового кровообращения изучено недостаточно. В наших экспериментах было проведено сравнение эндотелий-зависимых реакций пиальных артериальных сосудов крыс на орошение поверхности головного мозга раствором ацетилхолина до и в течение 21 дня после перенесенной однократной транзиторной ишемии-реинфузии, вызванной 12-минутной окклюзией обеих сонных артерий с одновременной управляемой гипотензией. В постишемическом периоде установлено снижение вазодилататорной функции эндотелия пиальных артериальных сосудов, вызванное изменениями функционирования системы эндотелий-зависимого синтеза оксида азота и структурными повреждениями сосудистого эндотелия. Максимальное изменение сосудистых реакций на ацетилхолин наблюдалось через 14 дней после ишемии.

Ключевые слова: ишемия, дисфункция эндотелия, пиальные сосуды.

POST-ISHEMIC CHANGES OF THE ENDOTHELIAL DEPENDENT VASOMOTION

Gorshkova O.P.[1], Shuvaeva V.N.[1], Lensman M.V.[1], Artemeva A.I.[1]

[1]I.P. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Science. St.-Petersburg, e-mail: o_gorshkova@inbox.ru

In this time the functional state of the vascular endothelium after cerebral ischemia is studied not finally. In our experiments in rats the pial arterial vessels endothelium dependent reactions on a brain surface irrigation by acetylcholine solution before and after the single short-term transient global cerebral ischemia (in 1 hour and 2, 7, 14 and 21 day) were compare. Transient global cerebral ischemia was induced in anesthetized Wistar rats by clamping of both common carotid arteries for 12 min with simultaneous controlled hypotension to 45±3 mm Hg, followed by blood reinfusion. In the post-ischemic time established the long lasting (3 weeks) decrease the number of vascular reactions on acetylcholine caused by changes of endothelial dependent NO synthesis system function, and structural damage of vascular endothelium. Maximal changes of vascular reactions on acetylcholine observed in 14 days after ischemia.

Keywords: cerebral ischemia, endothelial disfunction, pial vessels.

Известно, что при острой церебральной ишемии происходят последовательные процессы микроциркуляторного клеточного каскада, на определенных стадиях которого эндотелий претерпевает ряд существенных структурных и функциональных изменений: происходит повреждение базальной сосудистой мембраны, межэндотелиальных контактов и самой эндотелиальной выстилки церебральных сосудов [2; 4]. Эндотелий играет важную роль в регуляции сосудистого тонуса. Структурно-функциональные изменения эндотелия сосудов в результате ишемии могут нарушать ауторегуляцию мозгового кровотока и повышать вероятность возникновения повторных ишемических повреждений. В настоящее время внимание исследователей привлекает возможность комплексной оценки функционального состояния эндотелия с использованием биохимических, клеточных и функциональных методов определения дисфункции эндотелия. Исследование содержания молекул эндотелиального происхождения (метаболиты NO, воспалительные цитокины, молекулы адгезии, регуляторы тромбообразования, маркеры эндотелиального повреждения и

репарации) в циркулирующей крови позволяет оценить функциональное состояние эндотелиальных клеток. Для определения целостности сосудистого эндотелия проводят измерение циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) в периферической крови. Считается, что увеличение в крови числа зрелых ЦЭК является маркером системного прямого клеточного повреждения [9]. Оценка эндотелий-зависимой вазодилатации проводится с использованием методов, основанных на применении различных фармакологических веществ, в том числе и ацетилхолина (АЦХ), который может стимулировать выброс эндотелием окиси азота. Маркером эндотелиальной дисфункции в этих экспериментах является ослабление сосудорасширяющей реакции на введение ацетилхолина или ее извращение [8].

Несмотря на наличие большого количества работ, освещающих проблему острой цереброваскулярной ишемии, на сегодняшний день функциональное состояние эндотелия (его вазодилатационная функция) в период после ишемических нарушений мозгового кровообращения изучено недостаточно [1; 7], что и предопределило цель настоящего исследования. Целью работы являлась оценка функционального состояния эндотелия пиальных сосудов крыс до и в течение 21 дня после перенесенной ишемии головного мозга. В задачу исследования входило изучение реакций пиальных артериальных сосудов на орошение поверхности головного мозга раствором ацетилхолина и количества циркулирующих эндотелиальных клеток в периферической крови до и через 1 час и 2, 7, 14 и 21 день после однократной кратковременной транзиторной ишемии головного мозга.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на крысах линии Wistar массой 230-300 г. Для воспроизведения ишемии мозга использовали технику окклюзии двух сосудов с управляемой гипотензией [3]. У наркотизированных последовательным введением (в/бр.) золетила 50 (12,5 мг/кг массы) и домитора (0,02 мг/кг массы) крыс на 12 мин пережимались обе сонные артерии с одновременной управляемой гипотензией (снижение и строгое поддержание артериального давления (АД) на уровне 45±3 мм рт. ст. путем забора/реинфузии крови в гепаринизированный шприц). По окончании ишемии производили полную реинфузию забранной крови. После ушивания операционных ран и выхода из наркоза животных возвращали в клетки их обычного содержания.

Реакции пиальных артериальных сосудов на 3-минутное орошение поверхности головного мозга раствором ацетилхолин хлорида (Sigma) в концентрации 10^{-5} М сравнивали в группе интактных и в пяти отдельных группах ишемизированных крыс: через 1 час и 2, 7, 14 и 21 день после ишемии. Крыс наркотизировали уретаном (внутрибрюшинно, 125 мг/100 г массы тела). Среднее артериальное давление у наркотизированных интактных крыс

составляло 94.2±11.8 мм рт. ст., у перенесших ишемию – 92.5±10.9 мм рт. ст. Методом прижизненной микрофотосъёмки (х470) [3] через трепанационное отверстие в черепной кости фиксировали фоновое изображение сосудов и их реакцию на ацетилхолин. Эксперименты проводили в отсутствии и на фоне блокады эндотелиальной NO-синтазы (eNOS). В качестве блокатора eNOS использовали 1%-ный раствор L-аргинин метилового эфира (L-NAME) (в/в, из расчета 1,5 мг/100 г массы тела, Sigma).

Измерено 3115 участков сосудов. Рассматривали реакции сосудов 1-5-й генераций диаметром от 11 до 115 мкм [3]. В каждой генерации примерно в равной степени были представлены сосуды разного диаметра. Линейные размеры микрососудов с точностью до 2 мкм определяли с помощью стандартного объект-микрометра, калибровочных коэффициентов и программы Inspector Matrox. Измеряли ширину потока эритроцитов, соответствующую внутреннему диаметру сосуда. Оценивали число участков и изменение диаметра сосудов каждой генерации.

Количественные определения числа циркулирующих эндотелиальных клеток в периферической крови определяли по методу Hladovec J. в модификации Петрищева и соавт. [5]. Подсчет количества циркулирующих эндотелиальных клеток проводили в камере Горяева в 100 мкл плазмы крови, пересчитывая полученное число на 1 л плазмы.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стъюдента на двустороннем уровне значимости ($p<0.05$), для оценки силы связи между двумя переменными рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение

Орошение поверхности головного мозга интактных крыс раствором ацетилхолина вызывало разнонаправленные реакции пиальных артериальных сосудов. Число расширившихся сосудов составило в среднем 54.4±6.5%, 33.5±8.8% сосудов сузилось, диаметр 24.6±5.7% артерий достоверно не изменялся ($p<0.05$). Количество расширившихся сосудов от 1-й к 5-й генерации увеличивалось (коэффициент корреляции 0.769), а не изменивших диаметр – снижалось (коэффициент корреляции –0.892). Число сузившихся артерий в группах всех генераций достоверно не отличалось (коэффициент корреляции -0.377).

У крыс, перенесших ишемию, по сравнению с интактными в течение 21 дня после ишемии было отмечено снижение числа дилататорных реакций пиальных артериальных сосудов на АЦХ и увеличение числа констрикторных (рис. 1). Число сосудов, не изменивших диаметр, составляло в среднем 30.78±1.5% ($p<0.05$). При сравнении реакций сосудов различных генераций у ишемизированных крыс установлено отсутствие функциональной топографической гетерогенности изменений их диаметра на ацетилхолин.

Число расширившихся, сузившихся и не реагирующих сосудов в группах сосудов разных генераций достоверно не отличалось. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что перенесенная кратковременная ишемия мозга приводит к снижению функциональной активности эндотелия пиальных артериальных сосудов.

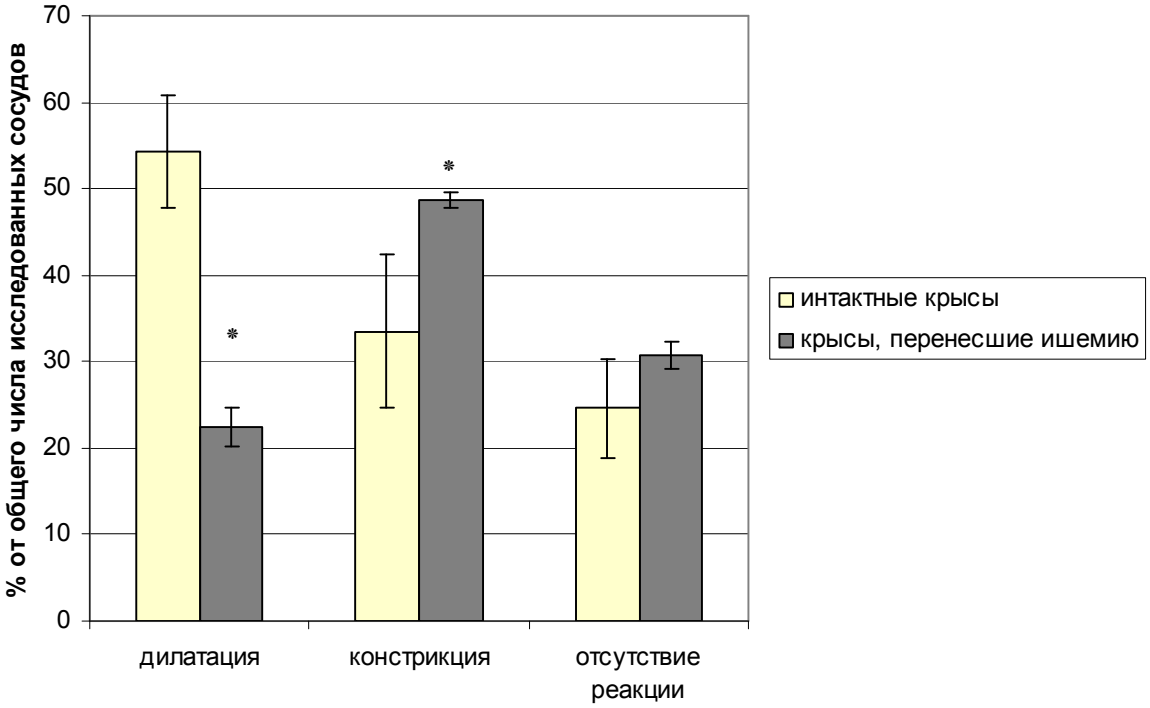

Рис. 1. Реакция пиальных артериальных сосудов крыс на ацетилхолин

*- достоверность между реакциями сосудов у интактных и перенесших ишемию крыс, *p<0,05.*

Изменение реакций сосудов на АЦХ в наших экспериментах отмечалось со 2-го дня после ишемии (таблица), и по мере увеличения времени, прошедшего после перенесенной ишемии, количество расширившихся и не изменивших диаметр сосудов достоверно уменьшалось, коэффициент корреляции составил соответственно -0.588 и -0.717, а число констрикций – увеличивалось (коэффициент корреляции 0.839). Максимальное изменение сосудистых реакций на АЦХ наблюдалось через 14 дней после ишемии (4.3±1.32% сосудов расширились, 76.16±4.91% - сузились, 21.26±5.25% - не изменяли диаметра, p<0.05) (таблица).

Реакции пиальных артериальных сосудов на ацетилхолин у интактных и перенесших ишемию крыс в отсутствии и на фоне блокады эндотелиальной NO-синтазы, относительно общего числа исследованных сосудов, %

	Реакция сосудов	Интактные крысы	Крысы после ишемии				
			1 час после ишемии	2 дня после ишемии	7 дней после ишемии	14 дней после ишемии	21 день после ишемии
Без блокады	Дилатация	54.4±3.8	40.6±5.9*	23.5±5.6*	15.3±4.4*	4.3±1.1*	20.4±3.2*
	Констрикция	33.5±8.8	31.4±5.8	25.4±7.1	48.7±5.8*	76.2±4.9*	61.9±5.3*
	Отсутствие реакции	24.6±5.7	27.9±3.9	51.1±4.3*	35.9±3.8*	21.3±5.3	17.7±4.7
На фоне блокады eNOS	Дилатация	30.3±9.7	50.7±10.5	48.5±5.5*	27.1±4.9	16.4±5.1*	30.4±8.3
	Констрикция	38.2±11.5	26.6±8.3	15.3±2.1*	33.6±6.1	48.5±7.2	37.9±5.9
	Отсутствие реакции	31.5±5	22.7±6.6	36.2±7.5	30.4±8.3	37.9±5.9	31.7±8.1

**– $p < 0,05$ по отношению к интактным крысам.*

Снижение эндотелий-зависимой вазодилатации может быть следствием изменения активности эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), снижения синтеза оксида азота (NO) из L-аргинина и чувствительности гладкомышечных клеток к NO или усиления деградации NO за счет взаимодействия с активными формами кислорода и др. [6; 10]. Для оценки функционирования системы синтеза NO мы использовали блокатор эндотелиальной NO-синтазы метиловый эфир L-аргинина (L-NAME). Внутривенное введение L-NAME интактным крысам приводило к уменьшению числа дилататорных реакций пиальных артериальных сосудов на АЦХ в среднем на 44.22% ($p<0.05$). Число сузившихся и не изменивших диаметр сосудов при этом достоверно не изменялось (таблица). У крыс, перенесших ишемию, при введении L-NAME изменение дилататорной реакции на орошение раствором ацетилхолина отмечалось в период от 2 до 14 дней после ишемии. Увеличивалось число расширившихся на АЦХ сосудов и амплитуда сосудистой реакции (рис. 2). Наибольшие изменения дилататорной реакции на АЦХ наблюдались через 14 дней после перенесенной ишемии (таблица). Число констрикторных реакций на ацетилхолин на фоне введения L-NAME достоверно уменьшалось уже через 2 дня после перенесенной ишемии. Снижение числа сузившихся артерий сохранялось на протяжении всего исследованного постишемического периода (21 день) и составило в среднем 36.44±3.82% ($p<0.05$).

Изменение числа сосудов, не реагирующих на орошение раствором АЦХ, на фоне L-NAME отмечалось только в группах крыс через 2, 14 и 21 день после перенесенной ишемии. На основе полученных данных можно предположить, что у крыс после перенесенной ишемии изменение вазомоторной функции эндотелия, вероятно, связано с нарушением продукции оксида азота на уровне ферментных систем.

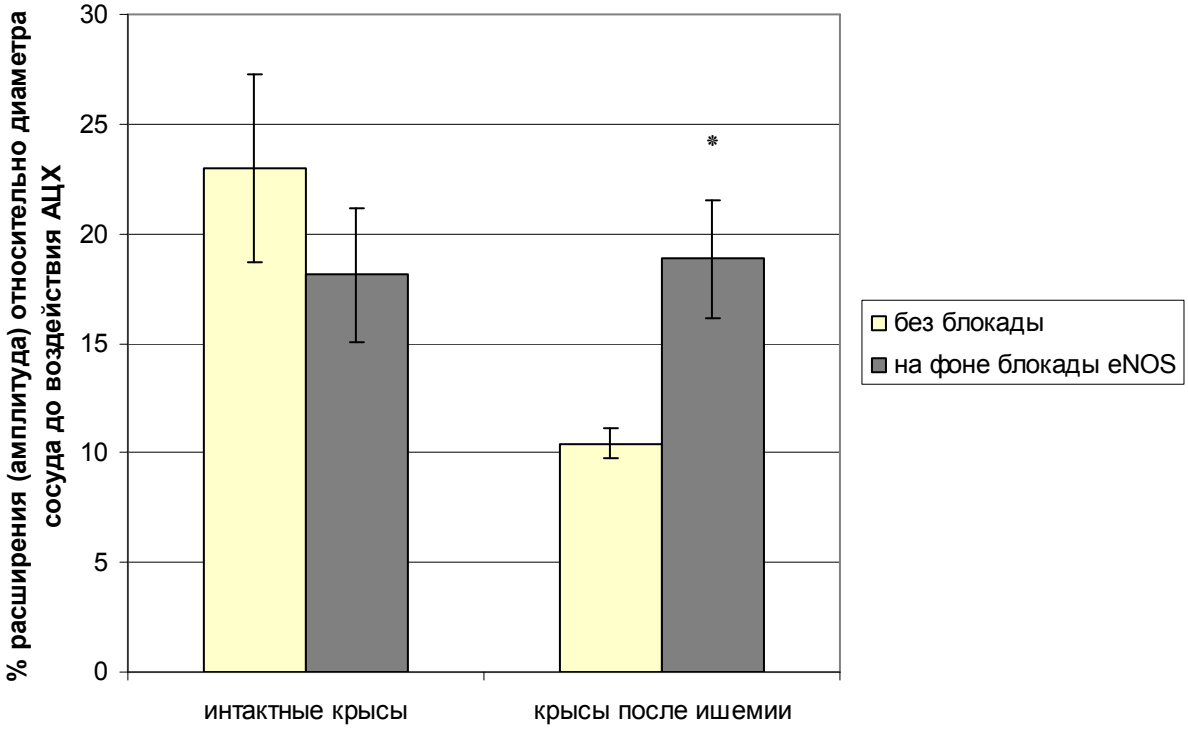

Рис. 2. Амплитуда дилататорной реакции пиальных артериальных сосудов на ацетилхолин у интактных и перенесших ишемию крыс

* - достоверность отличий между значениями до и после блокады eNOS, $p < 0,05$.

Изменение реакций на АЦХ также может быть связано с развитием структурных изменений эндотелиального слоя сосудистой стенки. Для проверки этого предположения нами была проведена серия экспериментов по определению количества циркулирующих эндотелиальных клеток в периферической крови. Исследования показали, что в плазме крови интактных крыс содержание эндотелиальных клеток составляло в среднем $(9,06 \pm 1,72) \times 10^4$ кл/л. Изменение числа циркулирующих эндотелиальных клеток в постишемическом периоде было обнаружено только через 7 дней после перенесенной ишемии (рис. 3). Отмечалось резкое, в среднем в 2 раза, увеличение содержания ЦЭК в крови, что может быть связано с усилением десквамации эндотелиальных клеток в результате повреждения эндотелия [5]. Нарушение целостности эндотелиального слоя с обнажением субэндотелиальных структур в этот отрезок постишемического периода может быть причиной наблюдавшегося нами в

дальнейшем (через 14 дней после перенесенной ишемии) наиболее значительного изменения эндотелий-зависимых сосудистых реакций на АЦХ.

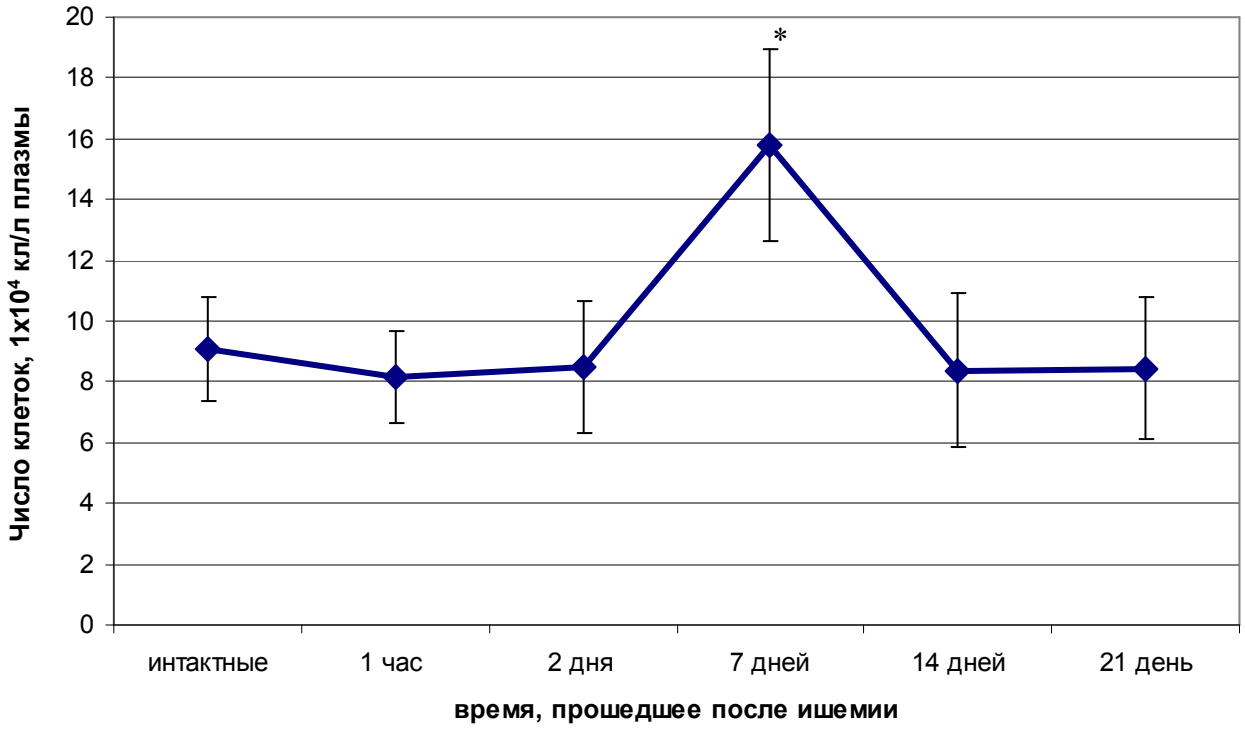

Рис. 3. Число циркулирующих десквамированных эндотелиальных клеток в 1 л плазмы крови

* - достоверность отличий, $p < 0,05$.

Заключение

Таким образом, нами было установлено, что однократная кратковременная транзиторная ишемия головного мозга приводит к угнетению эндотелий-зависимых вазодилататорных реакций пиальных артериальных сосудов на ацетилхолин, наблюдаемых в течение 21 дня после перенесенной ишемии. Снижение вазодилататорной активности эндотелия, вероятно, вызвано изменениями эндотелий-опосредованной продукции вазоактивных соединений, связанными с нарушением образования оксида азота на уровне ферментных систем, и структурными повреждениями сосудистого эндотелия.

Работа поддержана Программой Президиума РАН I.26П, проект 0134-2015-0002.

Список литературы

1. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Мамлеев А.В. Изучение вазодилатирующей и антитромботической функций эндотелия сосудов головного мозга крыс на различных моделях его ишемического повреждения // Современные проблемы науки и образования. –

2015. – № 5. - URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22406 (дата обращения: 15.09.2016).

2. Виничук С.М., Черенько Т.М. Ишемический инсульт: эволюция взглядов на стратегию лечения. – Киев : Изд-во ООО «Комполис», 2003.

3. Горшкова О.П., Шуваева В.Н., Ленцман М.В., Артемьева А.И. Влияние кратковременной ишемии головного мозга на адренореактивность пиальных сосудов крыс // Российский физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2016. – Т. 102, № 6. – С. 659-667.

4. Петрищев Н.Е., Власов Т.Д. Функциональное состояние эндотелия при ишемии-реперфузии : обзор литературы // Российский физиол. журнал им. И.М. Сеченова. – 2000. – Т. 86, № 2. – С. 148-163.

5. Петрищев Н.Н., Беркович О.А., Власов Т.Д. и др. Диагностическая ценность определения десквaминированных эндотелиальных клеток в крови // Клиническая и лабораторная диагностика. – 2001. – № 1. – С. 50-58.

6. Судаков Н.П., Никифоров С.Б., Пушкарев Б.Г., Клименков И.В., Новикова М.А., Липко С.В., Константинов Ю.М. Механизмы формирования митохондриальной дисфункции клеток сосудов под воздействием перекисно-модифицированных липопротеидов низкой плотности // Пат. физиология и экспериментальная терапия. – 2010. – № 1. – С. 48-51.

7. Суслина З.А., Танашян М.М., Домашенко М.А. Дисфункция эндотелия при ишемических нарушениях мозгового кровообращения // Неврология. – 2008. – Т. 1, № 2. - С. 4-11.

8. Тюренков И.Н., Поройский С.В., Воронков А.В. Оценка вазодилатирующей функции эндотелия сосудов брюшины на фоне стандартной операционной травмы // Волгоградский научно-медицинский журн. – 2012. – № 1. – С. 45-46.

9. Lampka M., Grabczewska Z., Jendryczka−Maćkiewicz E. et al. Circulating endothelial cells in coronary artery disease // Kardiologia Polska. – 2010. – Vol. 68, № 10. – P. 1100–1105.

10. Toutouzas K., Riga M., Stefanadi E. et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and other endogenous nitric oxide synthase (NOS) inhibitors as an important cause of vascular insulin resistance // Horm Metab Res. – 2008. – Sep. 40 (9). – P. 655-659.