

ИЗУЧЕНИЕ ДОЗОЗАВИСИМОГО ЭНДОТЕЛИОТРОПНОГО ВЛИЯНИЯ СОЕДИНЕНИЯ АТАСЛ В УСЛОВИЯХ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

А. В. Воронков¹, Э. Т. Оганесян¹, Д. И. Поздняков¹, В. Т. Абаев²

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт-филиал

ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет, Пятигорск,

²Северо-Осетинский государственный университет имени Коста Левановича Хетагурова, Владикавказ

В результате исследования установлено, что соединение АТАСЛ проявляет наиболее выраженное эндотелиопротекторное действие в дозе 100 мг/кг. При этом фармакологический эффект от применения данной дозы АТАСЛ был сопоставим с эффектом сулодексида.

Ключевые слова: ишемия головного мозга, эндотелиальная дисфункция, антиоксиданты, эндотелиопротекторы.

EXPERIMENTAL STUDY OF DOSE-DEPENDENT ENDOTHELIO TROPIC EFFECT OF АТАСЛ IN ISCHEMIC BRAIN DAMAGE IN RATS

A. V. Voronkov¹, E. T. Oganesyanyan¹, D. I. Pozdnyakov¹, V. T. Abaev²

¹Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, Affiliate of the Federal State-Funded Educational Establishment of Higher Education «Volgograd State Medical University»,

² The K.L. Khetagurov North Ossetian State University, Vladikavkaz, Russia

The study found that the АТАСЛ compound has the most pronounced endotheliotropic effect when administered at a dose of 100 mg/kg. The pharmacological effect of the administration of this dose of АТАСЛ was comparable with the effect of sulodexide

Key words: cerebral ischemia, endothelial dysfunction, antioxidants, endotheliopathy.

Нарушения мозгового кровообращения, в частности инсульт, на сегодняшний день, представляют огромную медико-социальную проблему [3]. Несмотря на существенные успехи ангионеврологии в понимании основных механизмов развития нарушений церебральной гемодинамики число случаев смертельного исхода от инсульта неуклонно увеличивается. Немаловажен тот факт, что только 20 % пациентов, перенесших инсульт, могут вернуться к прежней деятельности, таким образом, риск инвалидизации с потерей трудоспособности в результате инсульта также высок [5, 8]. Изменить сложившуюся тенденцию можно путем рациональной и своевременной фармакотерапии нарушений мозгового кровообращения [5].

Одним из основных патогенетических механизмов повреждения головного мозга в результате инсульта является индукция окислительного стресса [8]. Генерация активных форм кислорода (АФК) вызывает повреждение функционально активных молекул, таких как липиды, белки и ДНК. При этом существенна окислительная модификация клеток сосудистого эндотелия, приводящая к развитию эндотелиальной дисфункции (ЭД) [11]. В условиях инсульта формирование ЭД приводит к ухудшению церебральной микроциркуляции, повышенному тромбообразованию, индукции воспаления и пролиферации сосудистой стенки, что усугубляет течение заболевания и снижает шансы на его благоприятный исход [2, 11]. Таким образом, коррекция ЭД может считаться одной из основных стратегий лекарствен-

ной терапии нарушения мозгового кровообращения [11]. С этой целью возможно применение соединений, обладающих антиоксидантными свойствами, но поскольку при применении антиоксидантов высок риск «обратной» реакции с интенсификацией процессов окисления [9], важным становится выбор оптимальной дозы для проведения рациональной терапии, что, в свою очередь, и определило цель настоящего исследования.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить дозозависимое влияние соединения АТАСЛ на состояние эндотелия сосудов в условиях ишемии головного мозга.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 80 крысах-самцах линии Wistar, рандомизированных по возрасту и массе (половозрелые, массой 220—240 г), разделенных на 8 равных экспериментальных групп по 10 особей в каждой. Первую группу составили ложнопериорированные животные (Л/О). Второй (группа негативного контроля — НК) и последующим группам крыс моделировали фокальную ишемию головного мозга методом необратимой окклюзии правой средней мозговой артерии под местом ее пересечения с обонятельным трактом [1]. Группы животных с 3-й по 5-ю получали препараты сравнения: сулодексид (Вессел Дуэ Ф, Alfa Wasserman, Италия), в дозе 30 ЕВЛ [4] (единицы высвобождения липопротеин-липазы), мексидол (ФАРМАСОФТ, Россия) —

30 мг/кг [6], тиоктовая кислота (Октолипен, Фармстандарт-Лексредства, Россия) — 50 мг/кг [7]. Группы крыс с 6-й по 8-ю получали изучаемое соединение АТАСЛ в трех вариантах дозирования: 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг. Исследуемое соединение и препараты сравнения вводились перорально в виде водной суспензии непосредственно после воспроизведения ишемии головного мозга и на протяжении 3 суток. По истечении указанного времени проводили оценку состояния вазодилатирующей функции эндотелия сосудов, агрегационной активности тромбоцитов, как составляющей его антитромботической функции, и мониторинг сывороточной концентрации С-реактивного белка (СРБ), как показателя, характеризующего противовоспалительную функцию сосудистого эндотелия.

Вазомоторную функцию эндотелия сосудов оценивали по изменению средней систолической скорости (СК) локального мозгового кровотока на фоне внутривенного введения анализаторов эндотелиальной функции: ацетилхолин (АЦХ) 0,1 мг/кг (Sigma-Aldrich), L-аргинин 150 мг/кг (Panheas), нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) 15 мг/кг (Sigma-Aldrich). Эндотелий-независимую вазодилатацию оценивали по изменению СК при введении нитроглицерина (НТГ) 0,007 мг/кг (Биомед, Россия). СК регистрировали в проекции правой средней мозговой артерии, с помощью ультразвукового доплерографа, датчика УЗОП-010-01 с рабочей частотой 25 МГц и компьютерной программы MM-D-K-Minimax Doppler v. 1.7. (Санкт-Петербург, Россия). Агрегационную активность тромбоцитов (степень агрегации) определяли на лазерном двухканальном анализаторе агрегации АПАТ-2 БИОЛА (НПФ «БИОЛА», Россия). В качестве индуктора использовали АДФ (НПО «РЕНАМ», Россия) в конечной концентрации 5 мкМ. Концентрацию СРБ определяли методом латекс-агглютинации, с использованием набора реактивов Арбис+ (НПФ «Арбис+», Санкт-Петербург, Россия).

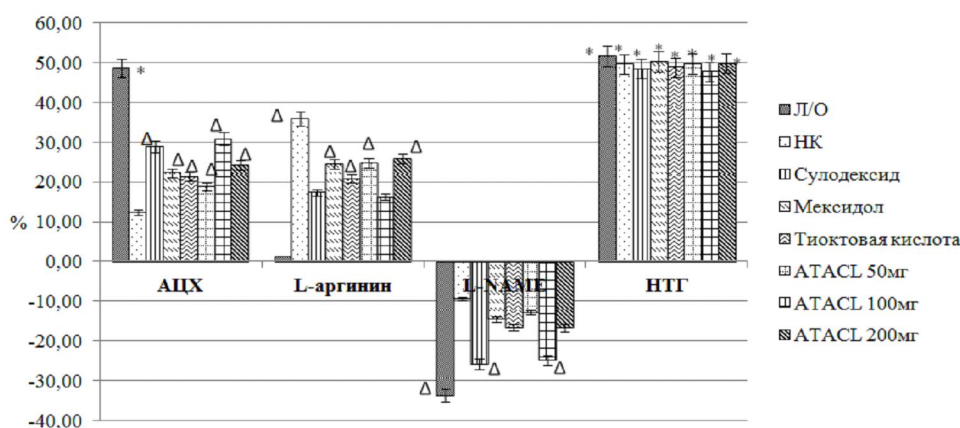
Результаты опытов обрабатывали методом вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., США для

операционной системы Windows). Полученные данные подвергались тесту 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 ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исходная скорость локального мозгового кровотока у Л/О группы животных составляла $(4,042 \pm 0,217)$ см/с. На фоне фокальной ишемии головного мозга у крыс СК снизилась в 2,8 раза ($p < 0,01$) — группа животных негативного контроля. У крыс, получавших сулодексид, мексидол и тиоктовую кислоту, исходная скорость церебрального кровотока была ниже аналогичного значения у ложнооперированной группы крыс в 2,4 ($p < 0,01$) раза, 2,2 ($p < 0,01$) и 2,6 ($p < 0,01$) раза соответственно. На фоне введения соединения АТАСЛ первоначальная СК для групп крыс, которым вводили 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг, составляла соответственно $(1,810 \pm 0,159)$ см/с, $(1,883 \pm 0,327)$ см/с и $(1,619 \pm 0,259)$ см/с.

Оценивая влияние различных доз соединения АТАСЛ и препаратов сравнения на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов в условиях фокальной ишемии головного мозга у крыс установлено, что у ложнооперированных животных скорость локального мозгового кровотока в ответ на введение АЦХ повышается на 48,7 % ($p < 0,01$) (рис. 1). Внутривенное введение L-аргинина данной группе крыс не вызвало существенных изменений церебральной гемодинамики, в то время как в ответ на введение L-NAME СК у Л/О животных уменьшилась на 33,7 % ($p < 0,05$). При этом следует отметить, что эндотелий-независимая вазодилатация, опосредованная введением НТГ, была сопоставима во всех экспериментальных группах (рис. 1) (скорость мозгового кровотока изменялась практически в равной степени).



*Статистически значимо (t-критерий Стьюдента) относительно исходной скорости кровотока ($p < 0,01$);

Δ статистически значимо (t-критерий Стьюдента) относительно исходной скорости кровотока ($p < 0,05$).

Рис. 1. Изменение вазодилатирующей функции эндотелия сосудов под влиянием различных доз соединения АТАСЛ на фоне фокальной ишемии головного мозга

На фоне фокальной ишемии головного мозга у группы крыс негативного контроля наблюдалось угнетение вазомоторной функции эндотелия сосудов, что подтверждается сниженной реакцией на введение АЦХ и L-NAME у данной группы животных, по сравнению с Л/О группой крыс (увеличение СК и ее падения составили 12,3 % и 9,3 % (рис. 1) соответственно). Также у НК группы животных отмечено значительное (на 35,9 %, $p < 0,05$) увеличение скорости мозгового кровотока при введении L-аргинина, что свидетельствует о развитии у данной группы животных феномена «L-аргининового парадокса», что подтверждается ранее проведенными исследованиями [1].

На фоне применения мексидола и тиоктовой кислоты скорость церебрального кровотока при введении АЦХ увеличилась соответственно на 22,3 % ($p < 0,05$) и 21,4 % ($p < 0,05$). В ответ на введение L-аргинина у крыс, получавших мексидол, СК увеличилась на 24,6 % ($p < 0,05$), а у животных, которым вводили тиоктовую кислоту, — на 20,9 % ($p < 0,05$). При внутривенном введении L-NAME скорость локального мозгового кровотока снизилась на 14,6 % (мексидол) и 16,6 % (тиоктовая кислота).

У крыс, получавших сулодексид, СК в ответ на внутривенное введение АЦХ увеличилась на 28,9 % ($p < 0,05$), а при введении L-NAME снизилась на 25,8 % ($p < 0,05$). При введении донатора NO-L-аргинина скорость церебрального кровотока у животных, получавших сулодексид, увеличилась всего на 17,4 %, что было ниже аналогичного значения НК группы крыс на 106,3 % ($p < 0,05$) (рис. 1). Полученные в ходе выполнения исследования данные подтверждаются ранее проведенными исследованиями, посвященными эндотелипротекторным свойствам мексидола, тиоктовой кислоты и сулодексида [2, 4, 6, 7].

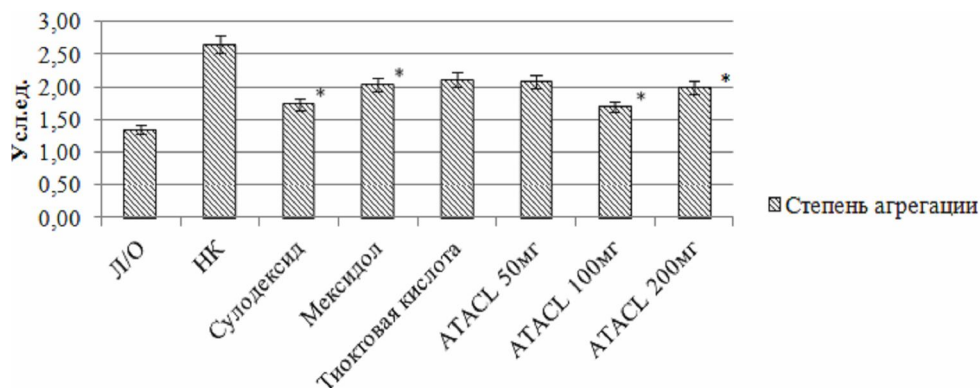
Анализируя данные, полученные при коррекции ишемии головного мозга введением соединения АТАСЛ, установлено, что наиболее выраженное воздействие на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов данное соединение оказало в дозе 100 мг/кг. При этом реакция сосудов (дилатация) в ответ на введение АЦХ при применении АТАСЛ в дозе 100 мг/кг увеличивала СК на 30,9 % ($p < 0,05$). В то же время применение

АТАСЛ в дозах 50 мг/кг и 200 мг/кг приводило к меньшему сосудистому ответу на введение АЦХ (скорость кровотока увеличилась на 18,9 % и 24,4 % ($p < 0,05$) соответственно). На фоне введения L-аргинина СК увеличилась на 24,9 % ($p < 0,05$) и 25,9 % ($p < 0,05$) соответственно при применении АТАСЛ в дозах 50 мг/кг и 200 мг/кг, в то время как скорость церебрального кровотока при введении L-аргинина крысам, получавшим АТАСЛ в дозе 100 мг/кг, увеличилась лишь на 16,2 % (рис. 1). Блокада синтеза оксида азота, посредством введения L-NAME животным, получавшим АТАСЛ в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг, привело к падению СК на 12,8 %, 24,9 % ($p < 0,05$) и 16,7 % соответственно.

Анализ агрегационной активности тромбоцитов показал, что степень АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов у Л/О группы крыс составляла ($1,345 \pm 0,114$) усл. ед. (рис. 2). Фокальная ишемия головного мозга способствовала увеличению данного показателя у группы крыс негативного контроля, по сравнению с Л/О животными, на 97,4 % ($p < 0,05$). Применение мексидола и тиоктовой кислоты, на фоне ишемического повреждения головного мозга, привело к снижению степени агрегации тромбоцитов относительно НК группы крыс на 30,5 % ($p < 0,05$) и 25,7 % соответственно (рис. 2). На фоне применения сулодексида степень агрегации кровяных пластинок по отношению к группе животных негативного контроля уменьшилась на 52,5 % ($p < 0,05$). Полученные данные согласуются с литературными источниками [2].

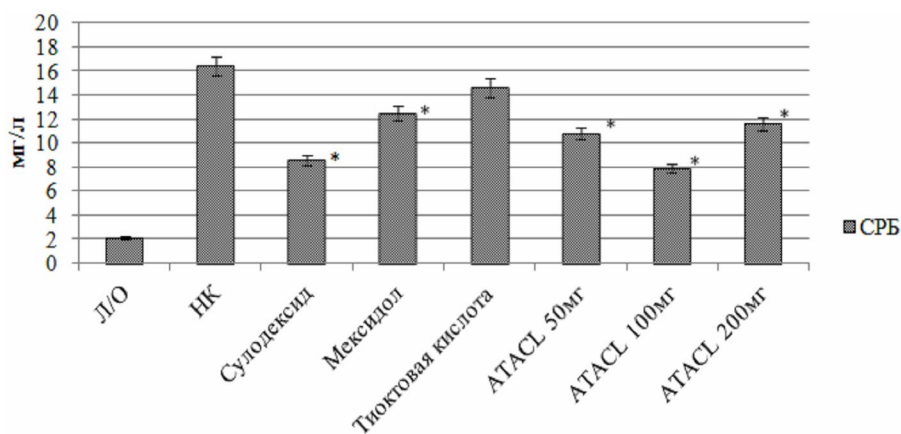
При введении соединения АТАСЛ в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг степень АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов уменьшилась (по сравнению с группой животных негативного контроля) на 27,8 %, 33,3 % ($p < 0,05$) и 56,4 % ($p < 0,05$) (рис. 2) соответственно. Таким образом, соединение АТАСЛ в дозе 100 мг/кг способствовало уменьшению агрегационного потенциала тромбоцитов практически в одинаковой степени с сулодексидом.

Концентрация С-реактивного белка у группы ложнооперированных животных составляла ($2,1 \pm 0,215$) мг/л. (рис. 3). На фоне ишемии головного мозга отмечено увеличение данного показателя в 7,8 раза ($p < 0,05$).



*Статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни) относительно группы животных негативного контроля ($p < 0,05$).

Рис. 2. Изменение агрегационной активности тромбоцитов на фоне введения различных доз соединения АТАСЛ при фокальной ишемии головного мозга



*Статистически значимо (*t*-критерий Стьюдента) относительно группы животных негативного контроля ($p < 0,05$).

Рис. 3. Влияние различных доз соединения АТАСЛ на концентрацию С-реактивного белка в условиях фокальной ишемии головного мозга

Применение мексидола, тиоктовой кислоты и сулодексида способствовало снижению концентрации СРБ, по сравнению с группой животных негативного контроля, на 31,2 % ($p < 0,05$), 12,3 % и 90,7 % ($p < 0,05$) соответственно.

Применение соединения АТАСЛ в дозах 50 мг/кг и 200 мг/кг способствовало снижению концентрации СРБ, по сравнению с НК группой животных на 51,9 % ($p < 0,05$) и 41,4 % ($p < 0,05$) соответственно. Введение АТАСЛ в дозе 100 мг/кг привело к уменьшению содержания С-реактивного белка, в сравнении с группой крыс негативного контроля, на 107,6 % ($p < 0,05$).

Изменения в вазодилатационной функции эндотелия сосудов, агрегационной активности тромбоцитов и концентрации СРБ при применении соединения АТАСЛ, вероятно, связаны с антиоксидантными свойствами данного соединения. Являясь производным гидроксикоричной кислоты, АТАСЛ, выступая в качестве «скэвенджера» свободных радикалов, возможно, способствует нивелированию одного из ведущих патогенетических звеньев в цепи «ишемического каскада» — окислительного стресса [2]. В результате, по всей вероятности, снижается окислительная модификация клеточных структур (индуцируемая активными формами кислорода), в том числе и эндотелиоцитов сосудов, что, в свою очередь, может способствовать нормализации эндотелий-зависимой продукции вазоактивных соединений (вазодилататоров, антиагрегантов и противовоспалительных агентов, например, NO), восстанавливая тем самым нарушенную эндотелиальную функцию. Дозозависимый эффект соединения АТАСЛ может быть объяснен «параболическим» характером действия антиоксидантов. В определенных условиях (например, введение неадекватной клиническому случаю дозы) антиоксидантный эффект сменяется прооксидантным, с интенсификацией клеточного повреждения, что ведет к уменьшению терапевтической эффективности применяемого антиоксиданта [10—12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Фокальная ишемия головного мозга приводит к угнетению вазомоторной функции эндотелия сосудов [отмечено снижение вазореактивности к ацетилхолину и L-NAME (увеличение и соответственно уменьшение скорости кровотока в ответ на введение данных анализаторов составило всего 12,3 % и 9,3 %, развитие феномена «L-аргининового парадокса» — увеличение СК на фоне введения L-аргинина от ее исходного уровня на 35,9 %, $p < 0,05$)], инициации синдрома гиперагрегации (повышение степени агрегации тромбоцитов на 97,4 %, $p < 0,05$) и активации процессов воспаления (увеличение концентрации С-реактивного белка в 7,8 раз, $p < 0,05$).

2. Применение мексидола, тиоктовой кислоты и сулодексида позволило скорректировать возникшие изменения. Причем введение мексидола оказало более значимое действие на агрегационный потенциал тромбоцитов и содержание С-реактивного белка, тиоктовой кислоты — на состояние вазомоторной функции сосудистого эндотелия. Применение сулодексида способствовало нормализации всех изучаемых параметров.

3. Соединение АТАСЛ оказало дозозависимый эндотелий-позитивный эффект. Введение данного соединения в дозе 50 мг/кг не оказало существенного влияния на изучаемые параметры (за исключением концентрации СРБ — отмечено ее снижение на 51,9 %, $p < 0,05$). Применение АТАСЛ в дозе 200 мг/кг способствовало восстановлению вазомоторной функции эндотелия, снижению степени агрегации тромбоцитов и концентрации С-реактивного белка. При этом эффект от применения данной дозы АТАСЛ был сопоставим с таковым у мексидола и тиоктовой кислоты и уступал сулодексиду. Введение АТАСЛ в дозе 100 мг/кг привело к нормализации всех изучаемых параметров, причем по степени эндотелий-позитивного воздействия соединение АТАСЛ в дозе 100 мг/кг превосходило мексидол и тиоктовую кислоту и было сопоставимо с сулодексидом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воронков А. В., Поздняков Д. И., Мамлеев А. В. Изучение вазодилатирующей и антитромботической функций эндотелия мозговых сосудов на различных моделях его ишемического повреждения // Современные проблемы науки и образования. — 2015. — № 5. — Режим доступа: <http://www.science-education.ru/128-22406> (дата обращения: 30.10.2016).

2. Воронков А. В., Поздняков Д. И., Мамлеев А. В. Сравнительная оценка влияния АТАСЛ, мексидола и тиоктовой кислоты на антитромботическую функцию эндотелия и некоторые показатели состава периферической крови экспериментальных животных на фоне фокальной ишемии головного мозга // Современные проблемы науки и образования. 2016. — № 2. — Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24398> (дата обращения: 30.10.2016).

3. Гусев Е. И., Мартынов М. Ю., Камчатнов П. Р. Ишемический инсульт. Современное состояние проблемы // Доктор. Ру. — 2013. — № 5 (83). — С. 7—12.

4. Изучение влияния сулодексида на эндотелий-зависимую вазодилатацию мозговых сосудов у животных со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом / И. Н. Тюренков и др. // Сахарный диабет. — 2011. — № 3. — С. 12—15.

5. Исакова Е. В., Воробьев П. А., Котов С. В. и др. Клинико-экономический анализ ведения больных с диагнозом «Инсульт» в ЛПУ Московской области // Клиническая геронтология. — 2006. — № 12 (11). — С. 40—3.

6. Корокин М. В., Пашин Е. Н., Бобраков К. Е. и др. Изучение эндотелиопротективного и коронарного действия производных 3-оксопиридина // Кубанский научный медицинский вестник. — 2009. — Т. 109, № 4. — С. 104—109.

7. Кочкаров В. И., Молчанова О. В., Покровская Т. Г. и др. Эндотелиопротективное действие комбинации ти-

октовой кислоты с розувастатином при L-NAME индуцированном дефиците оксида азота // Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация. — 2014. — Т. 182, № 11. — С. 192—193.

8. Нечипуренко Н. И., Пашковская И. Д., Мусиенко Ю. И. Основные патофизиологические механизмы ишемии головного мозга // Медицинские новости. — 2008. — № 1. — С. 7—13.

9. Gadacha W., Ben-Attia M., Bonnefont-Rousselot D., et al. Resveratrol opposite effects on rat tissue lipoperoxidation: pro-oxidant during day-time and antioxidant at night // Redox. Rep. — 2009. — № 14. — P. 154—158.

10. Galati G., Sabzevari O., Wilson J.X., et al. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics // Toxicology. — 2002. — № 177. — P. 91—104.

11. Giordo R., Cossu A., Pasciu V., et al. Different Redox Response Elicited by Naturally Occurring Antioxidants in Human Endothelial Cells // The Open Biochemistry Journal. — 2013. — № 7. — P. 44—53.

12. Pasciu V., Posadino A. M., Cossu A. Akt downregulation by flavin oxidase-induced ROS generation mediates dose-dependent endothelial cell damage elicited by natural antioxidants // Toxicol. Sci. — 2010. — № 114. — P. 101—112.

Контактная информация

Поздняков Дмитрий Игоревич — аспирант фармакологии с курсом клинической фармакологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, e-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru