

ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ В РАННИЙ ПЕРИОД ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ВВЕДЕНИИ ТАУРИНА

Т. А. Рукан, Н. Е. Максимович, С. М. Зиматкин¹

В исследовании на 28 лабораторных крысах-самцах с ишемией-реперфузией головного мозга установлено: наличие дисфункции эндотелия, проявляющееся в увеличении количества циркулирующих эндотелиальных клеток и уменьшении активности щелочной фосфатазы; активация тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза; изменения во фронтальных отделах коры головного мозга. Введение животным таурина оказало корригирующий эффект в отношении эндотелия и морфологических изменений в коре головного мозга, а также агрегационных свойств тромбоцитов и свертывания крови.

Ключевые слова: ишемия-реперфузия; головной мозг; эндотелий; гемостаз; таурин; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Острые нарушения мозгового кровообращения — одна из наиболее важных проблем современной медицины. Ишемический инсульт ведет к стойкой утрате трудоспособности и инвалидизации. Россия занимает второе место в мире по смертности от инсульта, что в 3–8 раз больше, чем в США, Франции, Швейцарии [8, 9]. Актуальность проблемы цереброваскулярных заболеваний в Беларуси можно с полным основанием определить как чрезвычайную, требующую концентрации усилий специалистов разных профилей для ее решения.

В основе ишемических повреждений головного мозга лежат разнообразные этиопатогенетические механизмы, такие как атеросклероз, тромбоз, нарушения гемодинамики вследствие повреждения сердечной мышцы и др. В последние десятилетия важное значение придается эндотелию, повреждение которого может явиться эффекторным звеном в патогенезе сосудистой патологии головного мозга. Как известно, эндотелий принимает непосредственное участие в поддержании сосудистого тонуса, атромбогенности сосудистой стенки, регуляции адгезии и агрегации тромбоцитов, проявляет про-, антикоагулянтную и фибринолитическую активность [2, 11].

Ранее установлена роль дисфункции эндотелия с изменениями в системы гемостаза в возникновении реперфузионных повреждений головного мозга [1, 4]. В связи с этим актуальным является поиск путей эндотелиопротекции для коррекции повреждений головного мозга, вызванных ишемией-реперфузией. С этой целью в качестве возможного эндотелиопротектора выбрана аминокислота таурин [6]. Таурин является антиоксидантом, осморегулятором, нейромедиатором, участвует в механизмах торможения в нейронах [10].

¹ Кафедра патологической физиологии им. Д. А. Маслакова (зав. — проф. Н. Е. Максимович), кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. С. М. Зиматкин) УО “Гродненский государственный медицинский университет”, Беларусь, 230009, Гродно, ул. Горького, 80.

Целью исследования явилось изучение морфофункционального состояния эндотелия сосудов у крыс с ишемией-реперфузией головного мозга при введении таурина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на лабораторных крысах-самцах массой 200–250 г ($n = 28$) в соответствии с Приказом Минздрава России № 267 от 19 июня 2003 г. “Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных”.

Животные были разделены на 4 группы. У крыс опытных групп моделировали ишемию головного мозга (ИГМ) двухсторонней перевязкой общих сонных артерий в течение 30 мин — группа 2. Третьей группе животных после 30-минутного ишемического периода осуществляли восстановление кровотока в течение 30 мин — ишемия-реперфузия головного мозга (И-Р ГМ). Четвертой группе животных моделировали И-Р ГМ и вводили таурин (5 мг/кг, внутривенно) непосредственно перед наложением лигатур (И-Р ГМ+Т). Контрольную группу составили ложнооперированные животные, которым окклюзию сонных артерий не проводили — группа 1. Все хирургические манипуляции проводили под наркозом (тиопентал натрия 60 мг/кг, внутривенно).

Кровь для исследования брали из общей сонной артерии и определяли количество циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) по методу Sinzinger [13] как маркера структурных нарушений в эндотелии сосудов.

В криостатных срезах фронтальной коры головного мозга, фиксированных в жидком азоте, с помощью компьютерного анализатора изображений, используя программу Image Warp (США), определяли активность щелочной фосфатазы (ЩФ) [3] — маркерного фермента транспортной активности эндотелиоцитов сосудов. Метод выявления ЩФ основан на появлении черного осадка сульфида кобальта. В гистологических препаратах фронтальной коры головного мозга, предварительно фиксированных в жидкости Карнуа и окрашенных

гематоксилин-эозином, оценивали морфологическое состояние микроциркуляторного русла.

Изучали показатели первичного и вторичного гемостаза. Первичный гемостаз исследовали методом агрегатометрии на агрегометре Solar (Минск, Беларусь), с использованием в качестве индуктора агрегации АДФ ($2,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л). Вторичный гемостаз изучали с помощью метода тромбоэластографии на гемокоагулографе ГКГМ-04-02 (Львов, Украина) [12].

Для сравнения величин во всех исследуемых группах использовали непараметрические критерии Манна-Уитни и Краскала-Уоллеса. Результаты выражали в виде медианы (Me) и рассеяния (25, 75 перцентилей). Статистическую обработку данных осуществляли с применением пакета Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У крыс с ИГМ отмечали увеличение количества ЦЭК (циркулирующие эндотелиальные клетки) в 2,3 раза ($p = 0,002$), по сравнению с 1-й группой, у крыс с И-Р ГМ — в 3,7 раза, по сравнению с данным показателем в контроле ($p = 0,002$), что в 1,6 раза больше, по сравнению с дореперфузионным периодом ($p < 0,05$). В условиях введения таурина количество ЦЭК снизилось, по сравнению с группой крыс с ИГМ и с И-Р ГМ, достигнув их количества у крыс контрольной группы ($p > 0,05$) (табл. 1).

При исследовании активности ЩФ в эндотелиоцитах сосудов головного мозга, отмечали ее уменьшение на 40,8 % при ИГМ и на 43 % — при И-Р ГМ, по сравнению с ее значением в группе контроль ($p = 0,002$), что отражает нарушение транспортной функции эндотелия при этих состояниях. Введение таурина привело к увеличению активности ЩФ на 60,7 % по сравнению с данным показателем в группе с ИГМ, и на 66,8 % — в группе с И-Р ГМ ($p = 0,002$). При этом активность ЩФ не отличалась от значений в контрольной группе ($p > 0,05$) (табл. 2).

У крыс с ИГМ отмечали увеличение степени агрегации и скорости агрегации тромбоцитов в 2,7 раза ($p = 0,006$) и в 2,5 раза ($p = 0,009$), соответственно, по сравнению с данным показателем в контрольной группе (табл. 1). У крыс же с И-Р ГМ отмечалось увеличение этих параметров в 3,9 раза ($p = 0,002$) и в 4 раза

($p = 0,003$), соответственно. Введение таурина, снижая степень агрегации и скорость агрегации тромбоцитов, по сравнению с данным показателем в группе с И-Р ГМ в 1,8 раза ($p = 0,009$) и в 2 раза ($p = 0,03$), соответственно, оказало корригирующий эффект.

При исследовании вторичного гемостаза у крыс с ИГМ отмечали уменьшение времени реакции (R), времени образования сгустка (k) и общего времени свертывания крови (T) на 51,5 % ($p = 0,002$), 21,2 % ($p = 0,01$) и 11,5 % ($p = 0,02$), соответственно, по сравнению со значениями показателей в контрольной группе, что указывает на активацию свертывания крови у данных животных.

У крыс с И-Р ГМ отметили уменьшение R на 64,9 %, по сравнению со значением показателя в контрольной группе ($p = 0,002$) и на 27,7 %, по сравнению со значением показателя в группе с ИГМ ($p = 0,008$). Константа k уменьшилась на 42,4 % по сравнению с данным показателем в группе контроль ($p = 0,002$) и на 26,9 % по сравнению с данным показателем в группе животных с ИГМ ($p = 0,009$). Показатель T снизился на 32,8 % по сравнению с данным показателем в контроле ($p = 0,002$) и на 23,9 %, по сравнению с данным показателем в группе животных с ИГМ ($p = 0,01$). Изменения показателей тромбоэластограммы у крыс с И-Р ГМ свидетельствуют о нарастании прокоагулянтного потенциала.

В условиях введения таурина отмечали увеличение времени реакции в 1,9 и в 2,7 раза, по сравнению с данным показателем у животных с ИГМ и И-Р ГМ, соответственно ($p = 0,002$). Константа k увеличилась на 63,2 % ($p = 0,002$), показатель T — на 53,5 %, по сравнению с данными показателями в группе животных с И-Р ГМ ($p = 0,002$), соответственно. Введение таурина оказало корригирующий эффект на показатели вторичного гемостаза.

Морфологическими исследованиями головного мозга выявлены изменения у крыс с ИГМ и И-Р ГМ в виде полнокровия сосудов, которое сопровождалось стазом и сладжем эритроцитов, отеком, наличием паретически расширенных и суженных сосудов. Введение таурина привело к снижению периваскулярного отека, уменьшению выраженности спазма или паретического расширения сосудов микроциркуляторного русла.

Таблица 1. Количество циркулирующих эндотелиальных клеток и показатели системы гемостаза у крыс при ишемии головного мозга, его ишемии-реперфузии и введении таурина, Me (Q25; Q75)

Группа животных	ЦЭК	Агрегация тромбоцитов		Показатели тромбоэластограммы, с		
		Степень агрегации, %	Скорость агрегации, %/мин	R	k	T
Контроль	13,2 (8,8;13,2)	16,1 (7,9;28,8)	19,2 (15,8;24,8)	268 (232;298)	198 (186;234)	934 (922;1276)
ИГМ	30,8* (30,8;35,2)	43,3* (30,1;60,0)	48,0* (32,8;76,2)	130* (118;136)	156* (150;186)	826* (658;910)
И-Р ГМ	48,8*^ (30,8;66,0)	62,3* (56,9;73,5)	76,6* (72,8;95,6)	94*^ (88;112)	114*^ (90;120)	628*^ (508;640)
И-Р ГМ+T	13,2^# (8,8;17,6)	37,1^# (18,3;42,5)	38,0^# (21,4;51,8)	250^# (190;298)	186^# (168;198)	964^# (838;1030)

Примечание. Здесь и в табл. 2 различия статистически значимы ($p < 0,05$):

* — с контрольной группой; ^ — с группой ИГМ; # — с группой И-Р ГМ.

ИГМ — ишемия головного мозга; И-Р ГМ — ишемия-реперфузия головного мозга; И-Р ГМ+T — ишемия-реперфузия головного мозга и введение таурина; ЦЭК — циркулирующие эндотелиальные клетки; R — время реакции; k — время образования сгустка; T — общее время свертывания крови.

Таблица 2. Активность щелочной фосфатазы в сосудах головного мозга крыс при его ишемии, ишемии-реперфузии и введении таурина, ед. опт. пл., Me (Q25; Q75)

Группа животных	Контроль	ИГМ	И-Р ГМ	И-Р ГМ+Т
Активность щелочной фосфатазы	0,872 (0,827;0,935)	0,516* (0,511;0,593)	0,497* (0,476;0,542)	0,829 ^{^#} (0,791;0,861)

В результате проведенных исследований у крыс с ИГМ и И-Р ГМ в ранний период отмечено наличие морфофункциональных изменений эндотелиоцитов, которые проявились повышением степени их десквамации, снижением активности ЩФ в сосудах головного мозга и активации первичного и вторичного гемостаза. Данные изменения могут быть обусловлены развитием окислительного стресса в реперфузионный период вследствие реоксигенации ткани головного мозга и несоответствия доноров и акцепторов электронов в электронно-транспортной цепи митохондрий. Выявленное повышение активности системы гемостаза в свою очередь может способствовать повторному развитию ишемии вследствие ретромбоза и развитию синдрома “no-reflow”, с возникновением “порочного круга” [5].

Нарушения эндотелия в свою очередь могут приводить к морфологическим изменениям в коре головного мозга вследствие возникающего вазодилаторно-вазоконстрикторного дисбаланса, повышения проницаемости сосудистой стенки, проявляющееся наличием патологически расширенных и суженных сосудов.

У крыс, получавших таурин, отмечали менее значительные изменения в головном мозге, что может быть обусловлено наличием эндотелиопротекторных свойств, а также осморегулирующих, антиоксидантных и нейромедиаторных эффектов [6, 7, 10].

Исходя из полученных данных целесообразно рекомендовать аминокислоту таурин для нейропротекции не только при ишемических, но и реперфузионных процессах в головном мозге.

ВЫВОДЫ

1. Восстановление кровотока в течение 30 мин после субтотальной ишемии головного мозга крыс сопровождается усугублением морфологических изменений микроциркуляторного русла, что связано с пролонгированием патогенетических механизмов повреждения в ишемическом периоде. Одним из механизмов усугубления повреждений головного мозга в ранний постишемический период является развитие дисфункции эндотелия.

2. Введение таурина оказывает церебропротекторный эффект у крыс с ишемией-реперфузией головного мозга, о чем свидетельствует снижение количества циркулирующих эндотелиальных клеток в 3,4 раза ($p = 0,002$), увеличение активности щелочной фосфатазы на 66,8 % ($p = 0,002$), по сравнению с данными показателями в группе крыс с ишемией-реперфузией мозга без введения таурина, а также его корригирующее влияние на показатели агрегации тромбоцитов и вторичного гемостаза, что может быть обусловлено широким спектром эффектов аминокислоты, включая эндотелиопротекцию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Бегер, Н. Е. Максимович, В. Р. Алексеевич, *Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования: материалы IV Междун. науч.-практ. конф.*, Витебск (2012), сс. 164 – 167.
2. В. В. Зинчук (ред.), Н. А. Максимович, В. И. Козловский и др., *Дисфункция эндотелия: фундаментальные и клинические аспекты*, Гродно (2006).
3. З. Лойда, Р. Госсрау, Т. Шиблер, *Гистохимия ферментов лабораторными методами*, Мир, Москва (1982).
4. Н. Е. Максимович, *Региональное кровообращение и микроциркуляция*, 3(2), 63 – 68 (2004).
5. Н. Е. Максимович, *Роль оксида азота в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений мозга*, Гродно (2004).
6. Т. С. Милош, Н. Е. Максимович, *Мед. журн.*, № 4, 64 – 66 (2009).
7. Л. И. Нефедов, *Таурин*, Гродно (1999).
8. А. И. Федин, В. Н. Евсеев, О. Р. Кузнецов, С. А. Румянцева, *Человек и лекарство. Актуальные вопросы медицины, Русский медицинский журнал*, 17(5), 332 – 334 (2009).
9. Е. И. Чуканова, *Фарматека*, № 17, 71 – 76 (2005).
10. М. В. Шейбак, Л. Н. Шейбак, *Медицинские новости*, № 10, 15 – 18 (2005).
11. R. J. Esper, R. A. Nordaby, J. O. Vilariuo, et al., *Cardiovasc. Diabetol.*, 5(4), 483 – 498 (2006).
12. H. Hartert, *Klin. Wochenschrift*, 26(37 – 38), 577 – 583 (1948).
13. H. Sinzinger, J. Virgolini, P. Fitscha, et al., *Br. J. Pharmacol.*, 25(6), 775 – 776 (1988).

Поступила 17.09.13

MORPHOFUNCTIONAL STATE OF VESSEL ENDOTHELIUM AT THE EARLY STAGE OF CEREBRAL ISCHEMIA-REPERFUSION AND THE EFFECT OF TAURIN ADMINISTRATION

T. A. Rukan, N. E. Maksimovich, and S. M. Zimatkin

Grodno State Medical University, ul. Gorkogo 80, Grodno, 230009, Belarus

Experiments in a group of 28 male rats with ischemic-reperfusion brain damage showed (i) the presence of endothelial dysfunction manifested by an increase in the number of circulating endothelial cells and a decrease in the activity of alkaline phosphatase, (ii) activation of the platelet and coagulation hemostasis, (iii) modification of the frontal brain cortex. The administration of taurin led to correction of the endothelial dysfunction, removal of morphological changes in the brain cortex, and improvement in the aggregation of platelets and blood coagulation.

Keywords: ischemia-reperfusion; brain; endothelium; hemostasis; taurin; rats