

Ю.М. Колесник¹, И.Ф. Беленичев¹, И.А. Мазур^{1,2}, А.В. Абрамов¹, Л.И. Кучеренко^{1,2}, Н.В. Бухтиярова¹

Экспрессия васкулоэндотелиального фактора роста и характеристика эндотелиоцитов сосудов головного мозга животных с церебральной ишемией: фармакологические эффекты нового метаболитотропного препарата Лизиний

¹Запорожский государственный медицинский университет,

²НПО «Фарматрон», г. Запорожье

Ключевые слова: церебральная ишемия, эндотелиальная дисфункция, васкулоэндотелиальный фактор роста, Лизиний.

Моделирование острого нарушения мозгового кровообращения путем билатеральной перевязки общих сонных артерий у белых беспородных крыс приводило к формированию эндотелиальной дисфункции капиллярной сети IV–V слоев коры и сосудов сосудистой оболочки мозга, сосудистого сплетения желудочков мозга, ветвей центральной мозговой и глазной артерий, что выражалось в значительном снижении плотности ядер эндотелиоцитов, уменьшении в них концентрации РНК, экспрессией васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) и значительным угнетением индекса пролиферативной активности эндотелиоцитов. Курсовое введение Лизиния в течение 21 суток в дозе 50 мг/кг внутривнутрибрюшинно крысам с ОНМК приводило к повышению плотности ядер эндотелиоцитов капиллярной сети коры головного мозга и сосудистой стенки сосудов мозга, повышению в них содержания РНК, а также к повышению пролиферативной активности сосудистого эндотелия, увеличению индекса их пролиферации за счет экспрессии VEGF.

Експресія васкулоендотеліального фактора росту і характеристика ендотеліоцитів судин головного мозку тварин з церебральною ішемією: фармакологічні ефекти нового метаболітотропного препарату Лізиній

Ю.М. Колесник, І.Ф. Беленічев, І.А. Мазур, А.В. Абрамов, Л.І. Кучеренко, Н.В. Бухтіярова

Модельовання гострого порушення мозкового кровообігу шляхом білатеральної перев'язки загальних сонних артерій у білих беспородних шурів призводило до формування ендотеліальної дисфункції капілярної мережі IV–V шарів кори і судин судинної оболонки мозку, судинного сплетення шлуночків мозку, гілок центральної мозкової та очної артерій, що виражалось у значному зниженні щільності ядер ендотеліоцитів, зменшенні в них концентрації РНК, експресією васкулоендотеліального фактора росту (VEGF) і значним пригніченням індексу проліферативної активності ендотеліоцитів. Курсове введення Лізинію протягом 21 доби в дозі 50 мг/кг внутрішньоочеревинно шурам з ОНМК призводило до підвищення щільності ядер ендотеліоцитів капілярної мережі кори головного мозку та судинної стінки судин мозку, підвищення в них вмісту РНК, а також до підвищення проліферативної активності судинного ендотелію, збільшення індексу їх проліферації за рахунок експресії VEGF.

Ключові слова: церебральна ішемія, ендотеліальна дисфункція, васкулоендотеліальний фактор росту, Лізиній.

Патологія. – 2011. – Т.8, №2. – С. 89–95

Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and description of endotheliocytes of brain vessels of animals with a cerebral ischemia: pharmacological effects of new metabolitotropic drug Liziniy

Yu.M. Kolesnik, I.F. Belenichev, I.A. Mazur, A.V. Abramov, L.I. Kucherenko, N.V. Buhtiarova

Model of acute stroke by bilateral ligation of common carotid arteries in white outbred rats led to endothelial dysfunction of capillary network of IV-V cortical layers and choroidal vessels of the brain, the choroid plexus of ventricles of the brain, central branches of cerebral and ocular arteries, which was manifested by significant reduction of endothelial nuclei density, RNA concentration decrease in them, by expression vasculoendothelial growth factor (VEGF) and by significant inhibition of endothelial cell proliferative activity index. Course administration of «Liziniy» within 21 days in a dose of 50 mg/kg intraperitoneally to rats with stroke has led to increase of density of endothelial capillary network of the cerebral cortex and the vascular wall of cerebral vessels, increase of RNA content in them as well as to the increase of proliferative activity of vascularendothelium, to increase of their proliferation index through the expression of VEGF.

Key words: cerebral ischemia, endothelial dysfunction, vascular endothelial growth factor, Liziniy.

Pathologia. 2011; 8(2): 89–95

Острые нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) являются важнейшей медико-социальной проблемой, что обусловлено их высокой долей в структуре заболеваемости и смертности населения, а также значительными показателями временных трудовых потерь и первичной инвалидности [1,5,12,17,18]. Показано, что в основе полиморфизма ОНМК лежат разнообразные патогенетические механизмы: атеротромбоз, церебральная эмболия, кардиогенные нарушения системной гемодинамики, изменения мелких

внутричерепных сосудов при артериальной гипертензии и др. [14,15,17]. Одним из основных звеньев процессов гемостатической активации, сопровождающих течение ОНМК, является уменьшение атромбогенных свойств эндотелия сосудистой стенки. В настоящее время основным объектом внимания нейрофизиологов, фармакологов и клиницистов стал эндотелий сосудов, который считается органом-мишенью для артериальной гипертензии, атеросклероза, сахарного диабета, мозгового инсульта и эффектором в патогенезе данных заболеваний

[5,12,13,18]. В последние годы сформировалось понятие об эндотелиальной дисфункции (ЭД), включающей его структурные и функциональные изменения и выражающейся в неадекватном образовании в эндотелии различных биологически активных веществ [5,18]. ЭД имеет значение в развитии тромбоза, неоангиогенеза, ремоделирования сосудов, внутрисосудистой активации тромбоцитов и лейкоцитов и т. д. [13,14]. Развитие и прогрессирование цереброваскулярных заболеваний, в т. ч. мозгового инсульта, обусловлено всеми перечисленными механизмами. Важным фактором, влияющим на исход ОНМК, является организация своевременной ургентной помощи больным с данным заболеванием [13,18]. Начиная с первых минут ишемического инсульта с позиций активного участия сосудистого звена в начальном дефиците локального мозгового кровотока с дальнейшим прогрессированием нейродеструкции, важную роль играет эндотелиопротективная терапия [1,5,13,18].

В последнее время все более широкое применение в практике ангионеврологии находит отечественный препарат L-лизина эсцинат [5,8,12,13].

В основе его мощного противовоспалительного, антиэкссудативного действия лежит способность повышать резистентность сосудов за счет уменьшения количества пор капилляров и их диаметра, мембранотропного эффекта и смачиваемости эндотелиоцитов, что облегчает направленный внутрь капилляра ток тканевой жидкости и снижает периваскулярный отек [6,13].

Также проведен ряд экспериментальных работ [1,2,9,13], которые выявили многочисленные положительные эффекты отечественного препарата тиотриазолина за счет его выраженного воздействия на патофизиохимические процессы ишемизированного мозга, что позволило отнести данный препарат к группе церебропротективных средств. Так, в эксперименте тиотриазолин, вводимый в остром периоде мозгового инсульта, приводил к существенному снижению биохимических маркеров повреждения мозговой ткани, снижал летальность, приводил к нормализации показателей углеводно-энергетического гомеостаза в ткани головного мозга, достоверно снижал уровень маркеров оксидативного стресса и повышал показатели антиоксидантной защиты в ткани мозга [2,3,8,13]. Регулирующее воздействие тиотриазолина на мозговой кровоток на уровне сосудов крупного и среднего калибра, поддержание проходимости микроциркуляторного русла и предупреждение периваскулярного отека в ишемизированных тканях сетчатки, а также клиническое подтверждение его модифицирующих свойств в отношении нитросоединений при ишемической болезни сердца являются свидетельствами наличия точек приложения препарата на уровне сосудистого звена [8,9,13].

С целью создания эффективного метаболитотропного эндотелиопротектора в НПО «Фарматрон» разработан новый препарат Лизиний, удачно сочетающий в своей структуре фрагменты молекул тиотриазолина и L-лизина эсцината и проявляющий высокие противоишемические,

кардиопротективные, нейропротективные, антиоксидантные и противовоспалительные свойства [6,7,11].

Цель работы

На основании выявленных особенностей дисфункции эндотелия сосудов головного мозга при моделировании острого нарушения мозгового кровообращения оценить эндотелиопротективное действие нового препарата Лизиний и обосновать его применение при патологии сердечно-сосудистой системы.

Материалы и методы исследования

В опытах использовали белых беспородных крыс массой 180–200 г, полученных из питомника Института фармакологии и токсикологии АМН Украины. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла 14 дней. Все экспериментальные процедуры осуществляли в соответствии с «Положением про использование животных в биомедицинских исследованиях».

В исследовании использовали модель острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) по типу ишемического инсульта. Данную модель воспроизводили путем двухсторонней окклюзии общих сонных артерий у экспериментальных животных [4]. Операцию проводили под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг). Развитие эндотелиальной дисфункции и эндотелиопротективную активность лизиния оценивали по морфофункциональным характеристикам эндотелиоцитов капиллярной сети коры головного мозга и сосудистой стенки сосудов головного мозга в острый (4 сутки) и восстановительный (21 сутки) периоды экспериментального нарушения мозгового кровообращения. Животных разных групп выводили из эксперимента на 4 и 21 сутки наблюдения под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг). Исследуемые препараты вводили внутривентриально, сразу после выхода животных из наркоза, в течение 4 и 21 суток – лизиний в дозе 50 мг/кг, пираретам – 250 мг/кг [8]. Всего использовано 70 животных, разделенных на семь групп:

- 1) интактные – (10 крыс);
- 2) контрольные – не леченные, с ОНМК, обследованные на 4 сутки (10 крыс);
- 3) животные с ОНМК, получавшие Лизиний, обследованные на 4 сутки (10 крыс);
- 4) животные с ОНМК, получавшие пираретам, обследованные на 4 сутки (10 крыс);
- 5) контрольные – не леченные, с ОНМК, обследованные на 21 сутки (10 крыс);
- 6) животные с ОНМК, получавшие Лизиний, обследованные на 21 сутки (10 крыс);
- 7) животные с ОНМК, получавшие пираретам, обследованные на 21 сутки (10 крыс).

В работе использовался Лизиний – 2,5% р-р для инъекций (НПО «Фарматрон») и пираретам – 20% р-р для инъекций в ампулах по 5,0 мл, «Санитас» (Латвия).

По окончании эксперимента, согласно протоколу исследования каждой модели, животных наркотизировали тиопенталом натрия (40 мг/кг), вскрывали черепную

коробку и извлекали головной мозг. Для морфометрических и гистоиммунохимических исследований головной мозг фиксировали в 10% жидкости Буэна (24 часа) и по стандартной схеме заливали в парафиновые блоки, из которых готовили серийные фронтальные 5-микронные гистологические срезы [11]. Для изучения морфофункционального состояния эндотелиоцитов капилляров IV-V слоев коры и стенки сосудов сосудистой оболочки мозга, сосудистого сплетения желудочков мозга, ветвей центральной мозговой и глазной артерий (далее по тексту: сосудов головного мозга) гистологические срезы депарафинировали по стандартной методике [11] и окрашивали галоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону для специфического выявления РНК. Для эндотелиальных клеток сосудов определяли следующие показатели [4]:

- площадь ядра;
- средний диаметр ядра, учитывая, что ядро эндотелиальной клетки сосудов в поперечном размере имеет форму сильно вытянутого эллипса, – минимальный эллиптический диаметр;
- концентрацию РНК в ядре (единицы оптической плотности, $E_{оп}$), которую рассчитывали как логарифм отношения оптической плотности ядра к оптической плотности межклеточного вещества;
- плотность ядер эндотелиоцитов как количество клеток на 1мм^2 площади среза коры мозга в области IV–V слоев коры и стенки сосудов сосудистой оболочки мозга, сосудистого сплетения желудочков мозга, ветвей центральной мозговой и глазной артерий.

Для определения пролиферирующих эндотелиоцитов гистологические срезы головного мозга депарафинировали и регидрировали, трижды по 5 минут отмывали фосфатным буфером (рН=7,4) и в течение 30 минут инкубировали с 2N соляной кислотой при $T=37^\circ\text{C}$. Затем дважды по 5 минут отмывали фосфатным буфером (рН=7,4), дважды по 5 минут отмывали боратным буфером по Холмсу (рН=8,4) и четырежды по 5 минут фосфатным буфером (рН=7,4), после чего в течение 30 минут инкубировали с 0,1% раствором трипсина в фосфатном буфере при $T=37^\circ\text{C}$. После инкубации срезы четырежды по 5 минут отмывали фосфатным буфером (рН=7,4), затем в течение 24 часов инкубировали во влажной камере при $T=4-6^\circ\text{C}$ с моноклональными антителами мыши к 5-бромо-2'-деоксиуридину (anti-BrdU, клон ВU-33) производства Sigma-Aldrich (кат. № В8434). После инкубации срезы четырежды по 5 минут отмывали фосфатным буфером (рН=7,4) и затем в течение часа при $T=37^\circ\text{C}$ инкубировали с вторичными антителами овцы к $F_{(AB)2}$ фрагменту IgG мыши, конъюгированными с флуоресцентным красителем FITC, производства Sigma-Aldrich (кат. № F2266). После заключительной четырехкратной отмывки фосфатным буфером (рН=7,4) срезы заключали в смесь глицерин-фосфатный буфер (9:1).

Анализ гистологических срезов проводили на микроскопе Axioskop (Zeiss, Германия) в ультрафиолетовом

свете. Для получения флуоресцентного изображения ядер эндотелиоцитов использовали высокоэмиссионный фильтр 38HE фирмы Zeiss (кат. № 489038-0000) с диапазоном возбуждения 450–490 нм, диапазоном эмиссии 500–550 нм, и специализированный объектив с широкой апертурой Fluor 40x/1.30 Oil фирмы Zeiss (кат. № 440260-9900). Изображение с помощью 8-битной CCD-камеры COHU-4922 (COHU Inc., США) вводили в компьютерную систему анализа изображений VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия) и обрабатывали в автоматическом режиме с помощью макропрограммы, разработанной в специализированной среде программирования VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Германия).

Определение экспрессии васкулоэндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor, VEGF) проводили по методике, в которой использовали первичные антитела IgG1 мыши к эндотелиальному фактору роста крысы/человека (клон СH-10), производства Chemicon (кат. № MAB1665). При этом вычисляли концентрацию VEGF в исследуемой ткани (единицы оптической плотности, $E_{иф}$), которую рассчитывали как логарифм отношения статистически значимой интенсивности флюоресценции к флюоресценции межклеточного вещества [4].

Статистическую обработку результатов проводили методами математической статистики с применением пакетов прикладных программ «Биостатистика для Windows, версия 4.03» и «Microsoft Excel 2002». Для каждого исследуемого признака определяли показатели среднего арифметического (M) и стандартной ошибки среднего арифметического (m). Нормальность распределения проверяли с использованием теста Колмогорова-Смирнова. При условии соответствия нормальности распределения достоверность полученных различий сопоставляемых величин оценивали с использованием t -критерия Стьюдента и U -критерия Уитни-Манна. Достоверность отличий относительных величин оценивалась с применением критерия χ^2 . Достоверными считали отличия с уровнем значимости более 95% ($p \leq 0,05$).

Результаты и их обсуждение

Изучение сосудистого компонента коры головного мозга, представленного капиллярной сетью, показало, что в острый период моделирования церебральной ишемии (4 суток после перевязки общих сонных артерий) наблюдается значительное снижение плотности ядер эндотелиоцитов капилляров (на 32,3%) на единицу площади среза коры головного мозга по сравнению с интактными животными (табл. 1). Это отражает процессы ишемизации коры мозга, формирование эндотелиальной дисфункции, закрытие капилляров и уменьшение плотности функционирующих. В восстановительный период экспериментальной ишемии головного мозга (21 сутки) наблюдается частичное восстановление капиллярной сети за счет ревазуляризации ишемизированных отделов. Тем не менее, плотность ядер эндотелиоцитов на эти сроки наблюдения остаются на 28% меньше, чем у интактных крыс.

Характеристика эндотелиоцитов капилляров IV–V слоев коры головного мозга крысы с экспериментальной церебральной ишемией, M±m

Экспериментальные группы	Плотность ядер на 1 мм ² коры	Площадь ядер, мкм ²	Диаметр ядер, мкм	Концентрация РНК в ядрах, E _{оп}
Интактные (n=10)	887±14	8,34 ±0,07	2,77±0,01	0,293±0,002
Ишемия, 4 сутки (n=10)	600±11	8,38±0,06	3,07±0,01	0,212±0,001
Ишемия, 4 сутки + Лизиний, 50 мг/кг (n=10)	727±10 ¹ (+21,2%)	9,87±0,03 ¹ (+17,8%)	3,11±0,01	0,315±0,001 ¹ (+48,6%)
Ишемия, 4 сутки + пирарцетам, 250 мг/кг (n=10)	608±15	8,40±0,07	3,06±0,01	0,217±0,001
Ишемия, 21 сутки (n=10)	633±15	9,11±0,03	3,05±0,01	0,268±0,001
Ишемия, 21 сутки + Лизиний, 50 мг/кг (n=10)	837±17* ¹ (+32%)	8,38±0,03* (-8%)	2,93±0,01*	0,298±0,002* ¹ (+11,2%)
Ишемия, 21 сутки + пирарцетам, 250 мг/кг (n=10)	650±15 (+2,7%)	9,05±0,05	3,02±0,01	0,273±0,001 (+1,8%)

Примечание: * – p<0,05 по отношению к контрольной группе на соответствующий срок эксперимента,

¹ – p<0,05 по отношению к группе пирарцетама на соответствующий срок эксперимента.

Моделирование ОНМК сопровождалось падением концентрации РНК в ядрах эндотелиоцитов капилляров на 27% по сравнению с интактными животными к 4 суткам после ОНМК и частичным восстановлением пула РНК к 21 суткам (табл.2).

Введение Лизиния оказывало эндотелиопротективный эффект в отношении эндотелиоцитов капилляров уже к 4 суткам, что проявлялось достоверным увеличением плотности ядер эндотелиоцитов (21%) на единицу площади среза коры, гипертрофией ядер (17%) и повышением в них концентрации РНК на 48%.

Наиболее выраженный эффект Лизиния отмечали на 21 сутки введения, что проявлялось практически полным восстановлением плотности эндотелиоцитов капилляров на единицу площади среза коры, повышением содержания РНК до интактного уровня. Данный факт может свидетельствовать о полной ревазуляризации и восстановлении капиллярной сети в коре головного мозга

ишемизированных животных, получавших Лизиний. Назначение животным с ОНМК референс-препарата пирарцетама в дозе 250 мг/кг не оказывало протективного действия в отношении эндотелия капилляров коры мозга.

Для более детальной характеристики процессов ревазуляризации изучены степень связывания васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) и характера пролиферативной активности эндотелия капилляров за 10 дней.

Установлено, что на 21 сутки после перевязки общих сонных артерий наблюдалось достоверное повышение связывания VEGF с сосудистым эндотелием капиллярной сети коры. Этот факт не противоречит данным других исследователей и нашим более ранним работам [3,12,13,19], в которых показано, что в острый период инфаркта миокарда или мозгового инсульта наблюдается угнетение экспрессии VEGF, а в восстановительном периоде происходит некоторое его повышение, свя-

Таблица 2

Характеристика пролиферирующих эндотелиоцитов капилляров IV–V слоев коры головного мозга крысы с экспериментальной церебральной ишемией, M±m

Экспериментальные группы	Плотность пролиферирующих клеток на 1 мм ² коры	Площадь ядер, мкм ²	Диаметр ядер, мкм	Концентрация VEGF, E _{иф}
Интактные (n=10)	771±26	6,77±0,10	2,88±0,02	0,78±0,01
Ишемия, 21 сутки (n=10)	474±22	7,41±0,10	2,92±0,02	0,81±0,02
Ишемия, 21 сутки + Лизиний, 50 мг/кг (n=10)	637±21 ¹ (+34,4%)	8,12±0,09 ¹ (+9,6%)	3,18±0,01* ¹ (+9%)	0,98±0,02* ¹ (+21%)
Ишемия, 21 сутки + пирарцетам, 250 мг/кг (n=10)	477±23	7,43±0,11	3,00±0,02	0,86±0,02

Примечание: * – p < 0,05 по отношению к контрольной группе на соответствующий срок эксперимента;

¹ – p < 0,05 по отношению к группе пирарцетама на соответствующий срок эксперимента.

Характеристика эндотелиоцитов стенки сосудов головного мозга крыс с экспериментальной церебральной ишемией, M±m

Экспериментальные группы	Плотность ядер на 1 мм ² стенки сосудов	Площадь ядер, мкм ²	Диаметр ядер, мкм	Концентрация РНК в ядрах, E _{оп}
Интактные (n=10)	14168±553	7,04±0,26	2,94±0,05	0,294±0,003
Ишемия, 4 сутки (n=10)	9938±373	8,00±0,25	3,18±0,04	0,231±0,002
Ишемия, 4 сутки + Лизиний, 50 мг/кг	12565±311 ¹ (+21%)	8,14±0,23	3,12±0,03	0,310±0,001 ^{*1} (+34,2%)
Ишемия, 4 сутки + пирацетам, 250 мг/кг (n=10)	9939±340	6,20±0,20	3,17±0,03	0,237±0,001
Ишемия, 21 сутки (n=10)	11378±281	5,43±0,11	2,71±0,03	0,247±0,001
Ишемия, 21 сутки +Лизиний, 50 мг/кг (n=10)	13987±411 ¹ (+23%)	8,05±0,29 ^{*1} (+48,3%)	3,14±0,05 ^{*1}	0,317±0,003 ^{*1} (+28,3%)
Ишемия, 21 сутки + пирацетам, 250 мг/кг (n=10)	11487±267	5,87±0,21	2,80±0,02	0,248±0,001

Примечание: * – p < 0,05 по отношению к контрольной группе на соответствующий срок эксперимента;

¹ – p < 0,05 по отношению к группе пирацетама на соответствующий срок эксперимента.

занное с восстановлением коллатерального кровотока. В восстановительном периоде мозгового инсульта VEGF индуцирует в мозге рост множества новых сосудов, а также подавляет воспалительную реакцию, а его дефицит указывает на формирование дисфункции эндотелия. Эти результаты подтверждают, что нарушение системной экспрессии VEGF может быть одним из этиологических факторов развития эндотелиальной дисфункции. Введение Лизиния позитивно влияло на данный процесс, о чем свидетельствовало повышение на 21% концентрации фактора роста эндотелия (VEGF) по сравнению с не лечеными животными на 21 сутки наблюдения. Ишемия угнетала пролиферативную активность сосудистого эндотелия капилляров коры мозга, что выражалось в снижении плотности пролиферирующих клеток на 1 мм² коры на 38%. Назначение Лизиния животным с ОНМК существенно увеличивало пролиферативную активность сосудистого эндотелия, о чем свидетельствовало достоверное повышение плотности, пролиферирующих эндотелиоцитов на 34%, площади и диаметра ядер пролиферирующих клеток по сравнению с группой не леченных животных.

Полученные данные свидетельствуют, что Лизиний, опосредованно через повышение экспрессии VEGF или самостоятельно, значительно повышает пролиферативную активность эндотелия в капиллярах коры головного мозга, способствуя эффективной ревазуляризации ишемически поврежденной нервной ткани в условиях экспериментального ОНМК.

Изучение стенки сосудов сосудистой оболочки мозга, сосудистого сплетения желудочков мозга, ветвей центральной мозговой и глазной артерий (далее по тексту: сосудов головного мозга) показало, что плотность ядер эндотелиоцитов здесь на порядок превышает аналогичный показатель капиллярной сети коры головного

мозга. В результате моделирования ОНМК путем билатеральной окклюзии общих сонных артерий на 4 сутки эксперимента наблюдается снижение плотности ядер эндотелиоцитов на 30% на единицу площади стенки сосудов, уменьшение концентрации РНК по сравнению с интактными животными (табл. 3).

Это свидетельствует о повреждении сосудов мышечного типа в зоне ишемии, что неотвратимо влияет на функциональное состояние микроциркуляторного русла мозга и формировании эндотелиальной дисфункции.

Вместе с тем, к 21 суткам церебральной ишемии плотность ядер эндотелиоцитов в стенках сосудов постепенно увеличивается, но остается на 19,7% меньше, чем у интактных крыс. Наблюдается снижение пула РНК в ядрах эндотелиоцитов стенки сосудов к 4 суткам после ОНМК и к 21 суткам после ОНМК дефицит РНК в ядрах эндотелиоцитов сосудов мозга составляет 16% (табл. 3).

При изучении степени связывания VEGF и характера пролиферативной активности эндотелия сосудов головного мозга установлено, что ишемическое повреждение мозга приводило к повышению связывания VEGF с эндотелием сосудов мозга в 2,5 раза на 21 сутки эксперимента. Введение лизиния животным с ОНМК в течение 21 суток интенсифицировало связывание VEGF с эндотелием сосудов на 40% по сравнению с группой контроля. Введение пирацетама не влияло на процесс связывания VEGF с эндотелием сосудов мозга. При моделировании ОНМК происходило угнетение пролиферативной активности сосудистого эндотелия сосудов мозга. Так, плотность пролиферирующих клеток к 21 суткам уменьшалась на 65% (табл. 4).

Введение Лизиния достоверно повышало плотность пролиферирующих эндотелиоцитов стенок сосудов головного мозга на 42,8%. Лизиний также увеличивал такие показатели пролиферации эндотелиоцитов сосудов

Характеристики пролиферирующих эндотелиоцитов сосудов головного мозга крыс с экспериментальной церебральной ишемией, M±m

Экспериментальные группы	Плотность пролиферирующих клеток на 1 мм ² коры	Площадь ядер, мкм ²	Диаметр ядер, мкм	Концентрация VEGF, E _{инф}
Интактные (n=10)	8430±893	14,78±0,86	3,82±0,12	1,34±0,08
Ишемия, 21 сутки (n=10)	2882±300	6,68±0,46	2,81±0,1	3,00±0,18
Ишемия, 21 сутки + Лизиний, 50 мг/кг (n=10)	4115±277* ¹ (+42,8%)	14,12±0,77* ¹ (+111,4%)	3,67±0,07* ¹ (+30,6%)	4,18±0,31 ¹ (+40%)
Ишемия, 21 сутки + пирацетам, 250 мг/кг (n=10)	2698±277	6,70±0,44	2,82±0,1	3,00±0,11

Примечание: * – p < 0,05 по отношению к контрольной группе на соответствующий срок эксперимента;

¹ – p < 0,05 по отношению к группе пирацетама на соответствующий срок эксперимента.

мозга как площадь ядер на 111% и диаметр ядер на 30%. Эти факты свидетельствуют о выраженном эндотелиопротективном действии Лизиния.

Моделирование ОНМК сопровождается уменьшением плотности ядер эндотелиальных клеток капилляров коры головного мозга к 4 суткам после ОНМК и частичному восстановлению капиллярной сети к 21 суткам. Отмечается достоверное увеличение степени связывания эндотелиального фактора роста с сосудистой стенкой, однако плотность пролиферирующих эндотелиоцитов и индекс их пролиферативной активности остается значительно ниже, чем у интактных животных к 21 суткам церебральной ишемии.

Введение лизиния повышает пролиферативную активность сосудистого эндотелия в капиллярах коры головного мозга. Моделирование церебральной ишемии сопровождается уменьшением плотности эндотелиоцитов стенки сосудов сосудистой оболочки мозга, сосудистого сплетения желудочков мозга, ветвей центральной мозговой и глазной артерий (т. е. сосудов головного мозга) к 4 суткам эксперимента с сохранением дефицита этого показателя к 21 дню наблюдения. Отмечается увеличение степени связывания васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) с сосудистой стенкой, однако плотность пролиферирующих эндотелиоцитов остается значительно ниже, чем у интактных животных даже к 21 суткам наблюдения. Курсовое введение Лизиния животным с ОНМК приводит к повышению плотности ядер эндотелиоцитов капиллярной сети коры и сосудистой стенки сосудов головного мозга, повышению пула РНК и активации трансляционной активности клеток начиная с 4 суток эксперимента и полному восстановлению плотности эндотелиоцитов на 21 сутки. Курсовое назначение лизиния животным с ОНМК приводит к повышению пролиферативной активности сосудистого эндотелия в сосудах головного мозга и капиллярной сети коры, увеличивает индекс их пролиферации как за счет влияния на васкулоэндотелиальный фактор роста (VEGF), так и, возможно, за счет самостоятельного действия на эндотелий.

Выводы

Моделирование ОНМК по типу ишемического инсульта путем билатеральной перевязки общих сонных артерий у белых беспородных крыс приводило к формированию эндотелиальной дисфункции капиллярной сети IV–V слоев коры и сосудов сосудистой оболочки мозга, сосудистого сплетения желудочков мозга, ветвей центральной мозговой и глазной артерий, что выражалось в значительном снижении плотности ядер эндотелиоцитов, уменьшении в них концентрации РНК. Моделирование церебральной ишемии сопровождалась экспрессией VEGF и значительным угнетением индекса пролиферативной активности эндотелиоцитов.

Наиболее выраженные проявления дисфункции эндотелия регистрировались на 4 сутки эксперимента (острый период) с сохранением показателей дисфункции эндотелия к 21 суткам наблюдения. Назначение Лизиния в течение 21 суток (50 мг/кг) экспериментальным животным приводило к повышению плотности ядер эндотелиоцитов капиллярной сети коры головного мозга и сосудистой стенки сосудов мозга, повышению в них содержания РНК, а также к повышению пролиферативной активности сосудистого эндотелия, увеличению индекса их пролиферации за счет экспрессии VEGF.

Введение референс-препарата Пирацетам не оказывало эндотелиотропного действия. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии выраженного эндотелиопротективного действия у исследуемого препарата Лизиний.

Литература

1. Беленичев И.Ф. Современные подходы к терапии острого нарушения мозгового кровообращения. Стратегии нейропротекции / Беленичев И.Ф., Бухтиярова, Серда Д.А. // Новости медицины и фармации. – 2008. – №5 (237). – С. 4–21
2. Беленичев И.Ф. Вплив модуляторів системи оксиду азоту на морфологічний тип загибелі нейронів в умовах ініціювання нітрозуючого стресу in vitro / Беленичев І.Ф., Абрамов А.В., Павлов С.В. // Фармакол. та лікарська токсикол. – 2009. – №4. – С. 23–27.
3. Влияние тиотриазолина на гистоморфологические изменения нейронов коры и гиппокампа в постинсультный период / И.Ф. Беленичев, И.А. Мазур, Ю.М. Колесник,

- А.В. Абрамов и др. // Укр. журн. экстрим. мед. – 2006. – Т. 7, №4. – С. 85–90.
4. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов: Метод. реком. Государственного Фармакологического Центра МОЗ Украины / И.С. Чекман, Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев, Л.А. Громов, Ю.М. Колесник, Н.В. Бухтиярова, С.В. Павлов, Н.А. Горчакова – К., 2010. – 81 с.
 5. *Малая Л.Т.* Эндотелиальная дисфункция при патологии сердечно-сосудистой системы / Малая Л.Т., Корж А.Н., Балковая Л.Б. – Харьков: ТОРСИНГ, 2000. – 315 с.
 6. *Мазур И.А.* Исследование влияния новой соли L-лизина на показатели окислительного стресса и развитие неврологического дефицита у животных с ОНМК / Мазур И.А., Беленичев И.Ф. // Запорож. мед. журн. – 2009. – Т. 11. – С. 48–51.
 7. *Мазур И.А.* Состояние энергетического обмена при остром нарушении мозгового кровообращения и его модуляция производными L-лизина / Мазур И.А., Беленичев И.Ф. // Патологія. – 2010. – Т. 7, №1. – С. 50–53.
 8. *Мазур И.А.* Метаболитотропные препараты / Мазур И.А., Чекман И.С., Беленичев И.Ф. и др. – Запорожье-Киев, 2007. – 309 с.
 9. Механізм енерготропної та антиоксидантної дії тіотриазоліну / І.А. Мазур, І.С. Чекман, І.Ф. Беленічев та ін. // Ліки. – 2006. – №1,2. – С. 23–30.
 10. Пат. Российской Федерации №21370492 Лизиний 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетат, проявляющий нейропротективное, ноотропное, кардиопротективное, эндотелиопротективное, противоишемическое, антиоксидантное, противовоспалительное и противогипоксическое действие и обладающий низкой токсичностью / Мазур И.А., Беленичев И.Ф., Колесник Ю.М., Кучеренко Л.И., Абрамов А.В. – СО7Д, А61К 31/41. – Заявлено 04.06.2007. – Опубл. 20.10.2009.
 11. *Пирс Э.* Гистохимия / Пирс Э. – М., 1962. – 962 с.
 12. Особенности функционального состояния эндотелия сосудов у новорожденных с постгипоксическими нарушениями сердечно-сосудистой системы / Н.В. Харламова, Т.В. Чаша, Г.Н. Кузьменко, И.Г. Попова // Детские болезни сердца и сосудов. – 2009. – №3. – С. 64–69.
 13. Рациональная нейропротекция / Беленичев И.Ф., Колесник Ю.М., Черний В.И. и др. – Донецк: ИД Заславского, 2008. – 264 с.
 14. *Blann A.D.* A reliable marker of endothelial cell dysfunction: does it exist? / Blann A.D., Tarberner D.A. // Brit. J. Haematol. – 2005. – №90. – P. 244–248.
 15. *Celermajer D.S.* Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis / Celermajer D.S., Sorensen K.E., Gooch V.M. et al. // Lancet. – 2002. – Vol. 340. – P. 1111–1115.
 16. *Deanfield J.* Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: A statement by the Working group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension / Deanfield J., Donald A., Ferri C., Giannattasio C. et al. // J Hypertes. – 2005. – №23 (1). – P. 7–17.
 17. *Taddei S.* The pivotal role of endothelium in hypertension / Taddei S., Virdis A., Chiadoni L., Salvetti A. // Medicographia. Issue 59. – 1999. – Vol. 21 (1). – P. 22–29.
 18. VEGF Effects Post-Stroke Recovery, Inflammation, and Vascular Repair.

Сведения об авторах:

Колесник Ю.М., д. мед. н., профессор, Заслуженный деятель науки и техники Украины, ректор ЗГМУ.

Беленичев И.Ф., д. биол. н., профессор, зав. каф. фармакологии и медицинской рецептуры ЗГМУ.

Мазур И.А., д. фарм. н., профессор, Заслуженный деятель науки и техники Украины, зав. каф. фармацевтической химии ЗГМУ, президент НПО «Фарматрон».

Абрамов А.В., д. мед. н., профессор каф. патологической физиологии, начальник Центральной научно-исследовательской лаборатории ЗГМУ.

Кучеренко Л.И., д. фарм. н., доцент каф. фармацевтической химии ЗГМУ.

Бухтиярова Н.В., к. мед. н., доцент каф. фармакологии и медицинской рецептуры ЗГМУ.

Адрес для переписки:

Беленичев Игорь Федорович. 69035, г. Запорожье, пр. Маяковского, 26, ЗГМУ.