

ВЛИЯНИЕ ФАРМАКОТЕРАПИИ НА ФУНКЦИЮ ПОЧЕК И ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

Расулова Х.А., Даминов Б.Т., Маджидова Ё.Н.

Ташкентский педиатрический медицинский институт

Ключевые слова: экспериментальный ишемический инсульт, почки, крысы, сыворотка крови, неоангиогенез, сукцинасол, тивортин, холина альфосцерат.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛ ИШЕМИК ИНСУЛЬТДА ФАРМАКОТЕРАПИЯНИНГ БУЙРАКЛАР ВА ТОМИРЛАР ЭНДОТЕЛИЙСИ ФУНКЦИЯЛАРИГА ТАЪСИРИ

Расулова Х.А., Даминов Б.Т., Маджидова Ё.Н.

Калит сўзлар: эксперименталишемик инсульт, буйраклар, каламушлар, қон зардоби, неоангиогенез, сукцинасол, тивортин, холин альфосцерати.

Ишнинг мақсади - каламушларда яратилган экспериментал ишемик инсульт (ЭИИ)да эндотелиал ва ренал дисфункция даражасини фармакотерапия фониди ўрганиш. Материал ва услублар. Экспериментлар 105 наслсиз оқ каламушларда ўтказилди. 20 та интакт каламуш назорат гуруҳини ташкил қилди. ЭИИ модели чап умумий уйқу артериясига лигатура қўйиш орқали чақирилди. Натижалар. Олинган натижалар экспериментал ҳайвонларда ЭИИда неоангиогенез фаоллашиши билан эндотелий дисфункциясидан далолат берди. Сукцинасол билан ўтказилган фармакотерапия даволанмаган гуруҳ кўрсаткичлари билан таққослаганда 7 кун давомида эндотелин-1 (ЭТ-1) миқдорининг бир оз камайишига олиб келди, лекин назорат гуруҳининг кўрсаткичларидан 2,5 бароварига юқори бўлди. Шу билан бирга, ТўЭО (томирлар ўсиши эндотелиал омили) даволанмаган каламушлар кўрсаткичларидан 1,65 бароварига камайди ($p < 0,01$), лекин контрол кўрсаткичлардан 1,74 бароварига юқори бўлди ($p < 0,01$). Каламушларда ривожланган ЭИИда пайдо бўлган протеинурия, микроальбуминурия ва креатининурия, чамаси, буйраклардаги гемодинамик ўзгаришлар ва копточкалар базал мембранаси ўтказувчанлиги бузилиши ҳамда токсинлар ва оксиллар маҳсулотлари парчаланиши билан боғлиқ бўлиши мумкин. Хулоса. ЭИИда неоангиогенез фаоллашиши билан кечувчи эндотелиал дисфункция ҳамда патологик жараёнга буйраклар жалб этилиши кузатилади. Фармакотерапия муайян даражада аниқланган ўзгаришларни коррекция қилади. Тивортин ва холин альфосцерати дори воситаларининг кўпроқ самараси, афтидан, гемодинамик бузилишларни камайтириш ва нейротрофик таъсирлари билан боғлиқдир.

INFLUENCE OF PHARMACOTHERAPY ON FUNCTION OF KIDNEYS AND VASCULAR ENDOTHELIUM IN EXPERIMENTAL ISCHEMIC STROKE

Rasulova Kh.A., Daminov B.T., Madjidova Y.N.

Key words: experimental ischemic stroke, kidneys, rats, blood serum, neoangiogenesis, suksinasol, tivortin, choline alfoscerate.

Aim of the study. To assess the degree of endothelial dysfunction and renal function in experimental ischemic stroke (EIS) in rats on the dynamics of pharmacotherapy. Materials and Methods. The subject of experimental studies were 105 adult mongrel white male rats. The object of the study were the serum and urine of rats. The model of cerebral circulation reproduced by temporary clipping of the left common carotid artery. The controls were 20 intact animals. Results. The results indicate to the development of endothelial dysfunction with EIS with the activation of neoangiogenesis in experimental animals. Pharmacotherapy with suksinasol for 7 days caused reduction of the level of ET-1 with respect to the values of untreated animal group and was still significantly higher than control group of rats in 2.5 times. At the same time, the level of VEGF A (vascular endothelial growth factor A) significantly decreased respectively to untreated group of rats in 1.65 times ($p < 0.01$), but was still higher than control values in 1.74 times ($p < 0.01$). Development of proteinuria, microalbuminuria and creatininuria in rats with EIS apparently was due to the development of hemodynamic changes in the kidney and glomerular basal membrane permeability, and due to the enhanced excretion of toxins and protein degradation products. Conclusion. The endothelial and renal dysfunctions with activation of neoangiogenesis develop on the model of EIS. Pharmacotherapy corrects the identified changes to some extent. Tivortin and choline alfoscerate were more effective, possibly, because of decrease of hemodynamic disturbances and neurotrophic effects.

В исследованиях последних десятилетий продемонстрирована тесная взаимосвязь между церебральной и кардиальной патологией, возникающей вследствие различных сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). Общность этиопатогенеза ССЗ привела к формированию общепринятых представлений об «ишемической болезни головного мозга и сердца» [1,4,6]. К сожалению, до настоящего времени в литературе недостаточно данных о распространенности сочетанной патологии сердца, головного мозга и почек. Головной мозг, сердце и почки в организме человека функционируют автономно друг от друга, но общим для них является высокое потребление кислорода и аденозинтрифосфата (АТФ), что определяет их высокую чувствительность к гипоксии. Сосудистая система выполняет коммуникативную функцию, и любые изменения сосудистой стенки (эндотелия), изменяя показатели центральной и периферической гемодинамики, будут способствовать изменению трансапиллярного обмена, развитию гипоксии и гипотрофии тканей [7,8]. В свою очередь, при локальных некротиче-

ских процессах при ишемии мозга или сердца продукты распада, поступая в кровь, циркулируют, способствуя развитию ответной реакции эндотелия, и экскретируются почками, что может привести к изменениям почечной паренхимы, то есть взаимно усугублять течение как первичного, так и вторичного повреждения органов и тканей. Данные литературы свидетельствуют о единых патогенетических механизмах развития и прогрессирования патологии почек и сердца [1,2].

Невыясненной остается роль факторов эндотелиальной дисфункции [фибронектин, фактор Вилленбранда, эндотелин-1 (ЭТ-1), тромбомодулин, простагландины, эндотелиальный фактор роста сосудов (ЭФРС) и др.] при различных патогенетических подтипах ишемического инсульта. Для практического невролога острым остается вопрос дифференциальной диагностики и тактики лечения различных подтипов ишемического инсульта (ИИ), а также ранней нейротропной, подразумевающей комплекс мероприятий, направленных на предотвращение или ослабление развития основных звеньев патобиохимического каскада, приводящих

к обратимым метаболическим изменениям нейронов или к их гибели при ИИ. Нейропротекция является одним из наиболее приоритетных направлений терапии ИИ. Основное ее направление — применение препаратов с нейромодуляторными и нейротрофическими действиями [3].

Сочетание ренальной дисфункции у больных с ИИ создает серьезные проблемы при определении тактики лечения таких больных, у которых она должна быть комбинированной нейро- и нефропротективной с учетом этих двух коморбидных состояний. Учитывая изложенное, представляет большой интерес изучение ангио-церебро-ренальной дисфункции путем определения состояния почек, факторов ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции (содержание в сыворотке крови продуктов оксида азота, аргинина, ацетилхолина, ЭФРС, ЭТ-1) при ИИ в эксперименте.

Цель исследования - оценить эндотелиальную и почечную дисфункции при экспериментальном ишемическом инсульте (ЭИИ) у крыс на фоне лечения цито- и нейропротекторами различной фармакологической направленности.

Материал и методы исследования

Экспериментальные исследования проводили на 105 половозрелых беспородных белых крысах-самцах с массой 160-220 г ($221,2 \pm 30,9$ г), находившихся на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде и пище. Объектом исследования служили сыворотка крови и моча крыс. Выбор объекта эксперимента был обусловлен сходством ангиоархитектоники головного мозга крыс и человека, а также близостью основных гемодинамических параметров. Все процедуры эксперимента соответствовали требованиям Международных правил гуманного отношения к животным, отраженным в Санитарных правилах по оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

Операции проводили под этиминаловым наркозом. Моделирование ЭИИ осуществляли путем наложения лигатуры на левую общую сонную артерию с дальнейшей реперфузией. Контрольную группу составили 20 интактных животных. О тяжести ишемического повреждения судили по степени неврологического дефицита, оцениваемого по шкале Stroke index McGraw в модификации НИИ неврологии РАМН через 2 ч после оперативного вмешательства и по динамике неврологического дефицита на 1-е, 3-и и 7-е сутки (табл. 1).

Таблица 1

Оценка тяжести неврологической симптоматики при ишемии головного мозга у крыс (McGraw, 1977).

Неврологические симптомы	Индекс ЭИИ
Вялость, замедленность движений	0,5
Тремор	1,0
Односторонний полуптоз	1,0
Двусторонний полуптоз	1,5
Слабость конечностей	1,5
Односторонний птоз	1,5
Маневные движения по кругу	1,5
Двусторонний птоз	2,0
Парез 1-4 конечностей	2,0-5,0
Паралич 1-4 конечностей	3,0-6,0
Коматозное состояние	7,0
Смерть	10,0

В зависимости от получаемой фармакотерапии экспериментальные животные были разделены на пять групп: 1-ю составили 21 крыса без ЭИИ (контрольная группа), получавшая воду для инъекций; 2-ю - 21 животное с ЭИИ, получавшее плацебо-терапию (стерильная вода для инъекций в дозе 10,0 мл/кг) в течение 1-7 дней (общая летальность к концу эксперимента составила 9,52%); 3-ю - 21 оперированное животное с ЭИИ, которому в течение 1-7 дней интраперитонеально вводили сукцинасол (фирма «REKA-MED FARM», Узбекистан) в терапевтических дозах из расчета 25,0 мл/кг в сутки однократным введением (общая летальность к концу эксперимента - 4,76%); 4-ю - 21 оперированное животное с ЭИИ, которому интраперитонеально вводили в течение 1-7 дней L-аргинин (тивортин фирмы «Юрия-Фарм», Украина) в терапевтических дозах из расчета по 8 мг/кг в сутки однократным введением (общая летальность к концу эксперимента - 0%); 5-ю - 21 оперированное животное с ЭИИ, которому в течение 1-7 дней интраперитонеально вводили холина альфосцерат (глиатилин фирмы «ИталФармако», Италия) в терапевтических дозах из расчета по 100 мг/кг в сутки однократным введением (общая летальность к концу эксперимента - 0%).

Все исследуемые препараты вводили через 2-3 ч после воспроизведения модели ЭИИ внутрибрюшинно 1 раз в сутки в течение 1-7 дней. Эффективность лечебного воздействия оценивали на 1-е, 3-и и 7-е сутки после ишемии-реперфузии как клинически, используя шкалу оценки внешних изменений в поведении крыс, так биохимически и морфологически.

Мочевыделительную функцию почек и особенности действия фармакотерапии изучали следующим образом. Спустя 24 ч после последнего введения препаратов каждой крысе внутривенно вводили дистиллированную воду из расчета 3,0 мл на 100 г массы тела и помещали в метаболическую клетку, собирали суточную мочу в индивидуальных боксах для сбора мочи, которую подвергали биохимическим исследованиям состава.

Ренальную дисфункцию изучали путем определения в сыворотке крови животных уровней мочевины и креатинина с помощью коммерческих наборов Urealiquicolor и Creatinineliquicolor (HUMAN, Германия) на биохимическом анализаторе Mindray BA-88A (Китай). Скорость клубочковой фильтрации (СКФ) рассчитывали по формуле Шварца (мл/мин/1,73 м² поверхности тела), которая чаще используется для пациентов детского и подросткового возраста [9]:

$$\text{клиренс креатинина (мл/мин)} = 0,0484 \times \text{рост (см)} \text{ или } 40 \times \text{рост}$$

$$\text{Cg крови (мкмоль/л)} \text{ Cg крови (мкмоль/л)}$$

Для определения факторов ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции спустя 24 ч после последнего введения препаратов животных всех групп под легким эфирным наркозом декапитировали и собирали кровь с последующим выделением сыворотки для определения концентрации ЭТ-1 (1-21) и ЭФРС (VEGF A) методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов Affymetrix Bioscience (Австрия) и Biomedica (Австрия).

Полученные при исследовании данные подвергали статистической обработке с помощью программного пакета Microsoft Office Excel-2012, включая использование встроенных функций статистической обработки. Использовали методы вариационной параметрической и непараметрической статистики с расчетом средней арифметической изучаемого показателя (M), стандартной ошибки среднего (m), относительных величин (частота, %) и их стандартных ошибок. Статистическую значимость полученных измерений при сравнении средних величин определяли по t-критерию Стьюдента при проверке нормальности распределения (по критерию эксцесса) и равенства генеральных дисперсий (F – критерий Фишера). За статистически значимые изменения принимали уровень достоверности $p < 0,05$. Статистическую значимость

различий для качественных величин вычисляли с помощью χ^2 критерия (хи-квадрат) Пирсона.

Результаты и обсуждение

В день проведения операции у крыс объективно наблюдались слабость и гипотония лапок на контралатеральной очагу стороне, сужение глазной щели (полуптоз) на стороне очага. Животные не могли упираться на лапки, не реагировали на уколы на стороне пареза, теряли аппетит, становились неаккуратными, неряшливыми и агрессивными. В 1-е сутки после операции при оценке неврологических отклонений у крыс с ЭИИ отмечено, что почти у всех (90-100%) животных наблюдались умеренные неврологические нарушения в виде вялости и замедленности движений. Выраженные неврологические нарушения, проявлявшиеся в виде манежных движений по кругу и параличей конечностей, были отмечены в 30-40% случаев. Неврологические нарушения без лечения (плацебо-терапия) были более выраженными к 7-м суткам эксперимента (табл. 2).

Таблица 2
Показатели неврологического статуса экспериментальных животных по шкале McGraw (баллы)

Группа	1-е сутки	3-и сутки	7-е сутки
ЭИИ + без лечения (плацебо)	7,3±0,69	8,2±0,62	10,6±0,62
ЭИИ + сукцинасол	7,4±0,64	6,5±0,32	8,9±0,96
ЭИИ + тивортин	7,0±0,69	6,9±0,87	6,6±1,07*
ЭИИ + холина альфосцерат	7,8±0,35	7,2±0,09	6,5±0,07*

Примечание. Звездочкой отмечены статистически значимые ($p<0,05$) различия между показателями леченой и нелеченой групп.

На фоне лечения динамика неврологических симптомов была положительной практически у всех животных с ЭИИ в виде нивелирования слабости и гипотонии лапок (у 70-80%), полуптоза (у 80%), манежных движений по кругу и параличей конечностей (у 30%). Улучшение неврологического статуса было более выраженным на фоне лечения холина альфосцератом и тивортином. Суммарный клинический балл неврологических нарушений по шкале McGraw в этих группах был ниже аналогичного показателя у нелеченых животных на 7-е сутки в 1,63 и 1,6 раза, составляя соответственно 6,5±0,07 и 6,6±1,07 балла ($p<0,05$).

Результаты исследования (табл. 3) показали развитие дисфункции эндотелия, проявляющейся активизацией вазоактивных факторов. Так, на 7-й день моделирования ЭИИ у крыс в сыворотке крови резко возрастает уровень ЭТ-1, превышая показатели контрольных животных в 3 раза ($p<0,001$). Содержание ЭФРС также достоверно возрастает, превышая значения контрольных крыс в 2,87 раза ($p<0,001$). Полученные результаты свидетельствуют о развитии дисфункции эндотелия при ИИ с активацией неонангиогенеза у экспериментальных животных.

Фармакотерапия сукцинасолом в течение 7 дней приводит к некоторому снижению уровня ЭТ-1 относительно значений нелеченой группы животных, однако его значения все еще достоверно превышают показатели контрольной группы крыс в 2,51 раза ($p<0,01$). В то же время содержание ЭФРС более выражено снижается относительно показателей нелеченой группы крыс в 1,65 раза ($p<0,01$), хотя все еще превышает контрольные значения в 1,74 раза ($p<0,01$).

При фармакотерапии ЭИИ тивортином отмечается более выраженное снижение уровня ЭТ-1 в сыворотке крови крыс. Значения данной группы ниже показателей нелеченой в 2 раза ($p<0,05$). Однако эти показатели сохранялись выше значений контрольной группы в 2 раза ($p<0,01$). Такая же динамика была отмечена и в содержании ЭФРС. Его значения при лечении тивортином снизились в 2,26 раза ($p<0,001$) относительно показателей нелеченой группы, но все еще до-

стоверно превышали значения контрольных животных в 1,27 раза ($p<0,05$). Изучаемые показатели были ниже значений группы крыс с ЭИИ, получавших сукцинасол.

Таблица 3

Содержание эндотелина-1 и фактора роста сосудов в сыворотке крови экспериментальных животных

Группа	ЭТ-1, фмоль/мл	ЭФРС, нг/мл
Контрольная (интактная)	7,97±0,35	140,04±12,51
ЭИИ+H ₂ O	24,03±2,14*	402,03±26,50*
ЭИИ+сукцинасол (25 мл/кг внутривенно)	20,01±1,80*	244,02±23,52***
ЭИИ+тивортин (8 мл/кг внутривенно)	16,03±1,24***	178,03±15,21***
ЭИИ+холина альфосцерат (100 мг/кг внутривенно)	19,82±1,69*	208,01±18,42***

Примечание. Звездочками отмечена статистически значимая ($p<0,05$) достоверность различия: одной - между показателями контрольной и опытной групп, двумя - между показателями леченой и нелеченой групп.

Фармакотерапия ЭИИ холина альфосцератом приводила лишь к некоторому снижению уровня ЭТ-1, однако эти значения носили статистически незначимый характер. Изучаемый показатель все еще статистически значимо превышал контрольные значения в 2,47 раза ($p<0,001$). В то же время содержание ЭФРС более выражено статистически значимо снижается относительно показателей нелеченой группы крыс - в 1,93 раза ($p<0,01$), но все еще превышает контрольные значения - в 1,48 раза ($p<0,01$).

Таким образом, при ЭИИ отмечается повышение содержания ЭТ-1 и ЭФРС. Фармакотерапия сукцинасолом и холина альфосцератом уменьшают изученные показатели, особенно более выражено высокие значения ЭФРС. В восстановлении дисфункции эндотелия наиболее эффективным оказался тивортин (L-аргинин). Однако, несмотря на это, изучаемые показатели сохранялись выше значений интактных крыс.

При исследовании ренальной дисфункции у экспериментальных животных, выявили, что степени отклонения уровня мочевины, креатинина в сыворотке крови и значений скорости клубочковой фильтрации (СКФ) по формуле Шварца в целом были незначительные. Первоначально лишь прослеживалась тенденция к повышению уровня мочевины при ЭИИ в 1,54 раза ($p<0,05$) относительно контрольных данных и незначительному снижению СКФ в 1,11 раза. Эти изменения были более выраженными на 7-е сутки эксперимента, что свидетельствует об ухудшении функции почек, связанном с гемодинамическими нарушениями и шоковым состоянием после острой ишемии головного мозга, что является угрожающим симптомом. На фоне фармакотерапии наблюдалась тенденция к улучшению этих показателей, особенно при применении тивортина.

Результаты анализа мочи лабораторных животных указывали на развитие протеинурии (повышение в 3,3 раза, $p<0,001$), микроальбуминурии (увеличение в 1,86 раза, $p<0,05$), креатининурии (повышение в 2,03 раза, $p<0,01$). Также наблюдались снижение суточного диуреза, лейкоцитурия и гематурия у крыс с ЭИИ. Видимо, они были обусловлены развитием гемодинамических изменений в почках и проницаемостью базальной мембраны клубочков, а также усиленным выведением токсинов и продуктов распада белков.

Фармакотерапия уменьшала выраженность этих изменений, особенно при применении тивортина и холина альфосцерата. Так, если при фармакотерапии сукцинасолом наблюдалась тенденция к уменьшению протеинурии и микроальбуминурии, то креатининурия достоверно снижалась

в 1,73 раза $p < 0,05$) относительно значений нелеченой группы животных. Эти показатели сохранялись выше значений интактных крыс в 4,23 ($p < 0,001$), 1,68 ($p < 0,05$) и 1,17 раза соответственно значениям общего белка, альбуминов и креатинина.

Фармакотерапия ЭИИ тивортином достоверно снижала протеинурию в 1,83 ($p < 0,01$) раза, микроальбуминурию – в 1,43 ($p < 0,05$) раза, креатининурию – в 2,03 ($p < 0,001$) раза относительно значений нелеченой группы животных. Если значения протеинурии и микроальбуминурии достоверно превышали показатели интактных крыс соответственно в 2,9 ($p < 0,001$) и 1,3 ($p < 0,05$) раза, то содержание креатинина приблизилось к значениям интактных крыс.

При лечении ЭИИ холина альфосцератом также достоверно снижалась выраженность протеинурии в 2,54 ($p < 0,001$) раза, микроальбуминурии – в 1,39 ($p < 0,05$) раза, креатининурии – в 2,03 ($p < 0,001$) раза относительно значений нелеченой группы животных. Если значения протеинурии и микроальбуминурии соответственно достоверно превышали показатели интактных крыс в 2,1 ($p < 0,01$) и 1,34 ($p < 0,05$) раза, то содержание креатинина приблизилось к значениям интактных крыс.

Выводы

Таким образом, на основании результатов исследования можно заключить, что при ЭИИ развивается дисфункция эндотелия и вовлекаются в патологический процесс почки. Фармакотерапия сукцинасомом в определенной степени корригировала выявленные изменения при ИИ. Более эффективными оказались тивортин и холина альфосцерат, что, видимо, обусловлено уменьшением гемодинамических нарушений и нейротрофическим действием.

Литература

1. Арьев А.Л., Овсянникова Н.А., Арьева Г.Т. Нефрология, 2011, №1, с. 76-83.
2. Даминов Б.Т., Эгамбердиева Д.А., Абдуллаев Ш.С. Мед. журн. Узбекистана, 2010, №4, с. 56-60.
3. Маджидова Ё.Н., Расулова Х.А. Ишемический инсульт (инфаркт мозга): клиника, диагностика, лечение. / Руководство для врачей. - Ташкент, 2011. - 232 с.
4. Расулова Х.А., Даминов Б.Т. Тер. вестн. Узбекистана, 2015, №1, с. 42-47.
5. Bugnicourt JM, Chillon JM, Godefroy J, Massy ZA. Relationship between silent brain infarction and chronic kidney disease. *NephrolDialTransplant.* 2009; 24 (6): 2005-2007.
6. Damman K, Navis G, Voors AA, Asselbergs FW, Smilde TD, Cleland JG, van Veldhuisen DJ, Hillege HL. Worsening renal function and prognosis in heart failure: systematic review and meta-analysis. *J CardFail.* 2007; 13 (8): 599-608.
7. Kruzliak P, Novák J, Novák M. Vascular endothelial growth factor inhibitor-induced hypertension: from pathophysiology to prevention and treatment based on long-acting nitric oxide donors. *Am J Hypertens.* 2014; 27(1): 3-13.
8. Pikula A, Beiser AS, Chen TC, Preis SR, Vorgias D, DeCarli C, Au R, Kelly-Hayes M, Kase CS, Wolf PA, Vasan RS, Seshadri S. Serum brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor levels are associated with risk of stroke and vascular brain injury: Framingham Study. *Stroke.* 2013; 44(10): 2768-2775.
9. Schwartz GJ, Work DF. Measurement and estimation of GFR in children and adolescents. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2009; 4: 1832-1843.