

ISSN 1561-9125

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ГЕРОНТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО

№ 5 2017
Том
Vol. 30

Успехи ГЕРОНТОЛОГИИ

Advances in Gerontology

Демография старения
Молекулярные механизмы
старения
Патогенез заболеваний,
ассоциированных с возрастом



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

И. Б. Соколова¹, Г. А. Рыжак², В. Х. Хавинсон^{1,2}

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ КУМУЛЯЦИЯ ВЛИЯНИЯ ПЕПТИДНОГО БИОРЕГУЛЯТОРА СОСУДОВ НА МИКРОЦИРКУЛЯЦИЮ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА У СПОНТАННО ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС

¹ Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6; e-mail: sib@kolt.infran.ru;² АНО НИЦ Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, 197110, Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3

В исследовании изучали влияние пептидного биорегулятора сосудов «Славином» на микроциркуляцию в коре головного мозга у спонтанно гипертензивных крыс разного возраста (6 и 12 мес). Показано, что однократное курсовое введение пептидного биорегулятора сосудов молодым животным повышает плотность микрососудистой сети в пиальной оболочке в 1,2 раза и не влияет на уровень перфузии и сатурации кислородом в сенсомоторной коре головного мозга. У гипертензивных крыс в возрасте 12 мес после двух курсов препарата «Славином» выявили наличие функциональной кумуляции: плотность микрососудистой сети была повышена в 1,6 раза; уровень перфузии повысился на 15% относительно интактных животных того же возраста. Животные этой группы легче переносили спазм сосудов головного мозга (апликация вазоконстриктора на поверхность мозга): сохраняли самый высокий по сравнению с другими экспериментальными крысами уровень тканевой сатурации кислородом при практически неизменной перфузии.

Ключевые слова: пептидный биорегулятор сосудов, головной мозг, гипертензия, плотность микрососудистой сети, перфузия, сатурация кислородом, молодые и старые животные

Разработка новых методов лечения артериальной гипертензии — одна из наиболее актуальных задач современных физиологии и медицины. Стойкое повышение АД значительно ухудшает циркуляцию крови в головном мозге. В экспериментальных работах и клинических исследованиях показано, что при развитии артериальной гипертензии происходит урежение микрососудистой сети в ткани головного мозга [8, 13], ремоделирование сосудистого русла [11, 13], понижение скорости кровотока [7, 12].

В ранее опубликованных работах мы показали, что один курс пептидного биорегулятора сосудов «Славином» приводил к значительному повышению плотности микрососудистой сети в пиальной

оболочке коры головного мозга старых (возраст 22–24 мес) крыс [2] и улучшению микроциркуляции в сенсомоторной коре [4]. Пептидный биорегулятор «Славином» представляет собой комплекс полипептидов с молекулярной массой 72–678 Да, экстрагированных из сосудов телят.

Целями представленного исследования было изучение влияния пептидного биорегулятора сосудов «Славином» на микроциркуляцию в коре головного мозга у спонтанно гипертензивных крыс разного возраста (6 и 12 мес) и выявление у них функциональной кумуляции при двукратном применении препарата.

Материалы и методы

Работа выполнена с использованием животных из биокolleкции ИФ РАН. Эксперименты проведены на спонтанно гипертензивных крысах-самцах линии SHR. Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище. Исследования проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных целей (Страсбург, 1986).

Для представленного экспериментального исследования было сформировано четыре группы крыс линии SHR (спонтанно гипертензивные крысы), *таблица*.

В качестве контрольной группы были использованы интактные нормотензивные крысы линии Wistar — Kyoto в возрасте 12 мес.

Все курсы препарата «Славином» (0,25 мг) осуществляли внутримышечно по схеме: одна инъекция в сутки в течение 5 дней, перерыв 2 сут, одна инъекция в сутки в течение 5 дней — всего 10 инъекций на курс.

Экспериментальные группы спонтанно гипертензивных животных линии SHR

Группа	САД, мм рт. ст.	Сатурация кислородом ткани сенсомоторной коры головного мозга, %
1-я — интактные крысы-самцы в возрасте 6 мес, $n=6$	185,6±5,2	97,8±0,4
2-я — крысы-самцы в возрасте 6 мес, которым за 2 мес до исследования (в возрасте 4 мес) был проведен один курс Славинорма, $n=14$	182,6±3,4	96,5±0,3
3-я — интактные крысы-самцы в возрасте 12 мес, $n=6$	190,7±3,3	96,1±0,3
4-я — крысы-самцы в возрасте 12 мес, которым было проведено два курса введения Славинорма: 1-й — в возрасте 4 мес; 2-й — в возрасте 10 мес (за 2 мес до исследования), $n=14$	191,1±3	97,8±0,3

Температуру тела животных в течение всего опыта поддерживали на уровне 37 °С.

Визуализацию, мониторинг микрососудистой сети, измерение перфузии и сатурации кислородом в ткани сенсомоторной коры головного мозга проводили через 2 мес после курсового введения Славинорма. Крыс наркотизировали золетилом — 20 мг/кг («Virbac», Франция) — интраперитонеально. Удаляли теменную кость и твердую мозговую оболочку, тем самым позволяя визуализировать пиальную оболочку сенсомоторной коры. Поверхность мозга непрерывно орошали физиологическим раствором при температуре 37 °С.

Для определения плотности микрососудистой сети животных помещали под объектив телевизионной установки (при общем ув. 40). Используя компьютерную программу «Photo M» (автор А. Черниговский), на статических изображениях подсчитывали общее количество сосудов на единицу площади.

Для измерения уровня перфузии и сатурации кислородом (SO_2) в сенсомоторной коре головного мозга использовали комплекс многофункциональной лазерной диагностики «ЛАКК-М» (НПП «Лазма», Россия). Данный комплекс определяет динамическую характеристику микроциркуляции крови — перфузию — изменение потока крови в единицу времени в исследуемом объеме ткани около 1 мм³ в относительных перфузионных единицах методом лазерной доплеровской флуометрии. Методом оптической тканевой оксиметрии оценивали SO_2 в этом же объеме ткани коры головного мозга. Исходно в стандартных условиях уровень перфузии и SO_2 регистрировали на поверхности каждого полушария в четырех точках с приблизительными координатами $AP=1, 2, 3, 4$ мм от брегмы; $SD=1,0$ мм латерально от сагиттального шва. Также изменения перфузии и SO_2 оценивали в условиях воздействия (апликации)

на поверхность головного мозга вазоконстриктора норадреналина ($10^{-3}M$).

При статистической обработке всех данных достоверность различий оценивали с помощью критерия Манна — Уитни, уровень достоверности различий $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При стойком повышении АД на сосудистую стенку артерий и артериол головного мозга оказывают влияние изменившиеся гемодинамические факторы (увеличение напряжения сдвига, усиление ламинарного потока и т. д.) и гуморальные факторы, характерные для гипертензии, в частности повышенное содержание в крови ангиотензина II, который вызывает спазм сосудов. Эти процессы запускают молекулярные сигнальные каскады, приводящие к эндотелиальной дисфункции и ремоделированию сосудистого русла [10, 11]. Длительное течение заболевания чревато осложнениями — формированием сосудистых аневризм, их разрывом (геморрагический инсульт) или утолщением сосудистой стенки и формированием атеросклеротических бляшек с полным закрытием мозговых сосудов (ишемический инсульт) [1, 15]. Славинорм обладает ангиопротективными свойствами [14]. Его применение при артериальной гипертензии направлено на восстановление микрососудистого русла головного мозга, поддержание метаболизма эндотелиальных клеток стенок сосудов [6]. Предполагаем, что устранение дисфункции сосудистого русла головного мозга может привести к восстановлению основных параметров микроциркуляции до уровня у нормотензивных животных.

В предыдущих работах было показано, что ремоделинг микрососудистого русла пиальной оболочки коры головного мозга у крыс линии SHR имел место уже в возрасте 3–4 мес, то есть еще до формирования стойкой артериальной гипертен-

зии. У этих животных была значительно понижена плотность микрососудистой сети в пиальной оболочке (в 1,4–1,9 раза) и уровень перфузии (в среднем на 24 %) [3] в сенсомоторной коре головного мозга по сравнению с нормотензивными крысами линии *Wistar – Kyoto* того же возраста. В возрасте 4–6 мес у крыс линии *SHR* уже сформировалась стойкая артериальная гипертензия [9]. Возрастные изменения у животных линии *SHR* менее выражены, чем у крыс с нормальным АД [5]. По мере старения от 6 до 12 мес у интактных крыс линии *SHR* АД значимо не изменялось (см. таблицу).

Применение одного курса Славинорма привело к повышению плотности микрососудистой сети пиальной оболочки сенсомоторной коры головного мозга у крыс в возрасте 6 мес линии *SHR* в 1,2 раза (статистически достоверно), рис. 1. При этом уровень перфузии в сенсомоторной коре повысился от $23,8 \pm 1,3$ до $25,1 \pm 1,1$ пф (статистически недостоверно), рис. 2, а тканевое SO_2 не изменилось (см. таблицу). Следовательно, один курс Славинорма у молодых крыс линии *SHR* приводит к активации ангиогенеза в пиальной оболочке сенсомоторной коры, но не влияет на динамические характеристики микроциркуляции в головном мозгу.

Чтобы восстановить микроциркуляцию в коре головного мозга до уровня у нормотензивных животных, был проведен повторный курс пептидного биорегулятора сосудов. Установлено, что через 2 мес после второго курса Славинорма у крыс линии *SHR* (4-я группа) плотность микрососудистой сети в пиальной оболочке сенсомоторной коры повысилась примерно в 1,6 раза (статистически достоверно), см. рис. 1. Уровень перфузии у животных 4-й группы был выше, чем у интактных *SHR* того же возраста, примерно на 15 %, но ниже, чем у интактных нормотензивных животных в возрасте 12 мес (см. рис. 2). SO_2 в ткани коры головного мозга у всех групп животных было примерно одинаковым (см. табл.1).

Таким образом, при двукратном применении с разницей в полгода пептидного биорегулятора сосудов спонтанно гипертензивным животным выявлена функциональная кумуляция — увеличение плотности микрососудистой сети и уровня перфузии в сенсомоторной коре головного мозга. По всем параметрам микроциркуляции крысы линии *SHR* в возрасте 12 мес, получившие два курса препарата «Славинорм», соответствовали

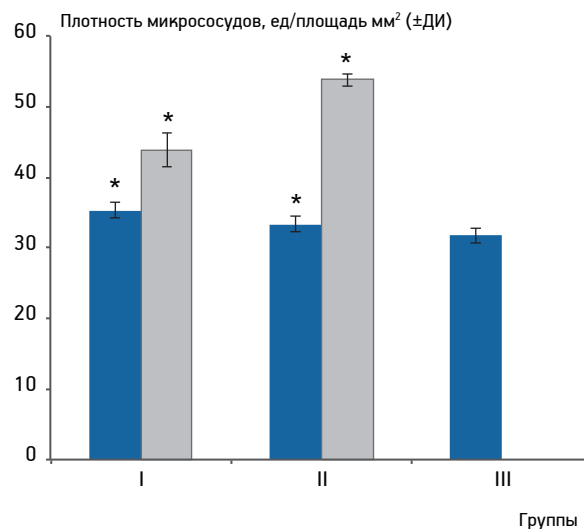


Рис. 1. Плотность микрососудистой сети пиальной оболочки сенсомоторной коры у интактных крыс-гипертоников линии *SHR* и после применения пептидного биорегулятора сосудов.

Темные столбики — плотность микрососудистой сети пиальной оболочки сенсомоторной коры головного мозга у интактных животных (* $p < 0,05$); светлые столбики — то же у животных, получавших пептидный биорегулятор сосудов ($p < 0,05$).

Здесь и на рис. 2, 3: по оси абсцисс — группы животных:
I — крысы-гипертоники линии *SHR* 6 мес;
II — крысы-гипертоники линии *SHR* 12 мес;
III — контрольные животные линии *Wistar–Kyoto* 12 мес

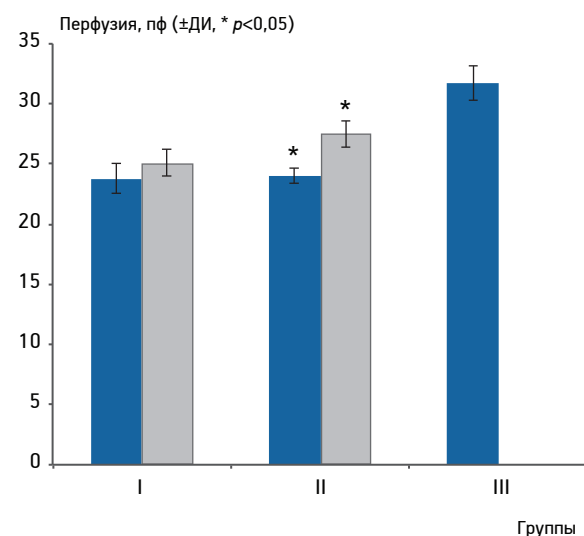


Рис. 2. Перфузия в ткани сенсомоторной коры головного мозга у крыс.

Темные столбики — перфузия в ткани сенсомоторной коры головного мозга у интактных животных; светлые столбики — то же у животных, получавших пептидный биорегулятор сосудов

нормотензивным животным той же возрастной категории.

Лица, особенно пожилого возраста, страдающие артериальной гипертензией, достаточно часто реагируют на неблагоприятные внешние факторы (гипоксия, повышенная тревожность, усталость, изменения погоды и т. д.) спазмированием сосудов головного мозга. В связи с этим представляется важным выявить влияние препарата «Славинорм» на микроциркуляцию в коре головного мозга у гипертензивных животных под воздействием вазоконстриктора. В экстремальных условиях ауторегуляция направлена на поддержание кислородного снабжения ткани головного мозга на постоянно высоком уровне. Как видно из данных рис. 3, а, при аппликации вазоконстриктора норадреналина (NA) на поверхность головного мозга у молодых интактных крыс линии SHR поддерживался высокий уровень тканевой сатурации кислородом, а интактные нормотензивные и гипертензивные крысы в возрасте 12 мес имели тканевое SO_2 примерно на 5 % ниже. Вероятно, при воздействии на поверхность мозга вазоконстриктора большее значение имеет возраст животных: старые крысы переносят спазм сосудов головного мозга хуже, чем молодые.

Под воздействием NA в разных точках измерения уровень перфузии мог понижаться или возрастать. У контрольных крыс линии Wistar—Kyoto величина уменьшения ($26,8 \pm 2,7\%$) и увеличения ($26,4 \pm 4,2\%$) уровня перфузии под воздействием NA была примерно одинаковой (см. рис. 3, б). Следовательно, для поддержания тканевой SO_2 на уровне $94,6 \pm 0,5\%$ у крыс этой группы не увеличивается средний уровень перфузии. У крыс линии SHR несколько иная картина. У интактных гипертензивных животных 6 и 12 мес в большинстве точек измерения уровень перфузии повышался в среднем на $46,7 \pm 13$ и $38,1 \pm 9,2\%$, соответственно, тогда как понижение перфузии в других точках измерения составляло $29,2 \pm 4$ и $15,1 \pm 3\%$, соответственно. Следовательно, для того чтобы под воздействием NA сохранить SO_2 в ткани коры головного мозга на уровне 94–97 % (см. рис. 3, а), у этих животных повышается тканевая перфузия на 17 и 23 %, соответственно (см. рис. 3, б). У крыс линии SHR в возрасте 6 мес, которые получили один курс препарата «Славинорм», были выявлены аналогичные изменения перфузии под воздействием NA: степень уменьшения составила $31 \pm 4,6\%$, а увеличения — $57 \pm 17,6\%$. Следовательно, для поддержания SO_2 в ткани коры головного мозга на уровне

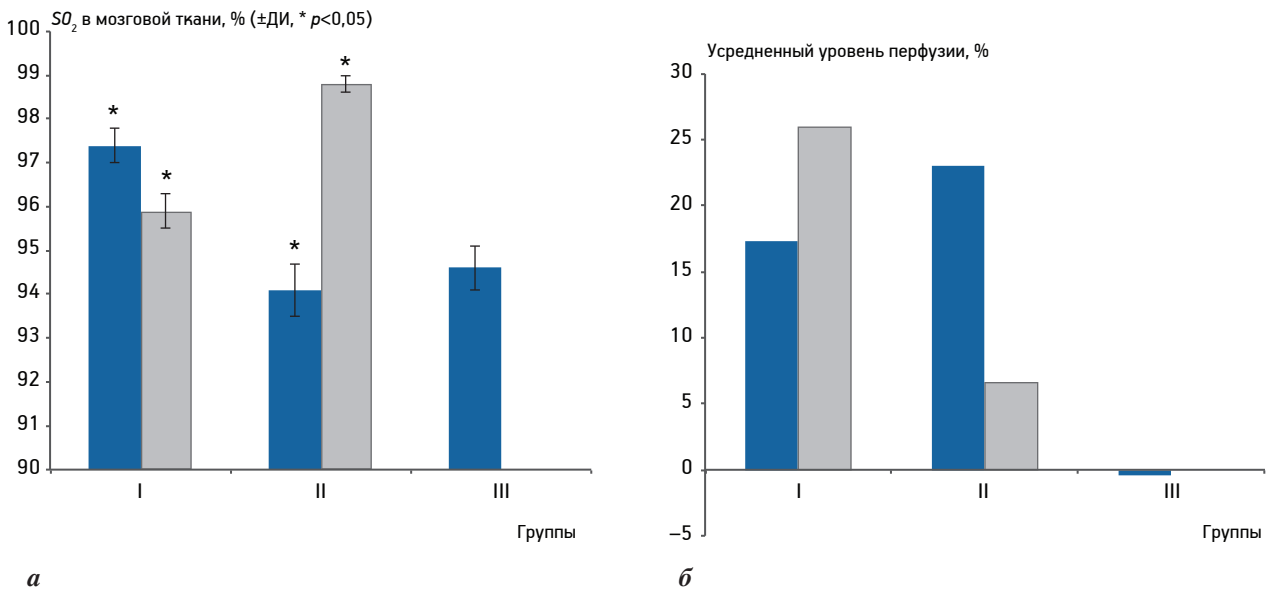


Рис. 3. Изменение сатурации кислородом и перфузии в ткани сенсомоторной коры головного мозга у крыс под воздействием вазоконстриктора (аппликация норадреналина на поверхность мозга).

а — SO_2 в ткани сенсомоторной коры головного мозга у крыс под воздействием вазоконстриктора; темные столбики — SO_2 в ткани сенсомоторной коры головного мозга у интактных животных; серые столбики — то же у животных, получавших пептидный биорегулятор сосудов;

б — усредненный уровень изменения перфузии в ткани сенсомоторной коры головного мозга у крыс под воздействием вазоконстриктора: темные столбики — усредненный уровень изменения перфузии в ткани сенсомоторной коры головного мозга у интактных животных; серые столбики — то же у животных, получавших пептидный биорегулятор сосудов

95,9±0,4% у этих животных повышается средняя перфузия на 26% (см. рис. 3, б). У крыс линии SHR в возрасте 12 мес, которые получили два курса пептидного биорегулятора сосудов, в большинстве точек измерения уровень перфузии понизился на 29,6±3,8%, а в других увеличился на 36,3±13,2%. При этом у данной группы животных под воздействием вазоконстриктора сохранялась самая высокая тканевая сатурация кислородом — 98,8±0,2%, а усредненная перфузия повысилась только на 6,7%.

Заключение

Таким образом, однократное курсовое введение пептидного биорегулятора сосудов «Славином» молодым спонтанно гипертензивным крысам позволило повысить плотность микрососудистой сети пиальной оболочки и не повлияло на другие параметры микроциркуляции в коре головного мозга. При повторном применении Славиорма в результате функциональной кумуляции плотность микрососудистой сети возросла примерно в 1,6 раза, а уровень перфузии — в среднем на 15%. Применение пептидного биорегулятора сосудов не влияло на уровень тканевой сатурации кислородом в коре головного мозга и на АД у животных всех возрастов. Однако функциональная кумуляция позволила старым спонтанно гипертензивным крысам легче переносить спазм сосудов головного мозга.

Литература

1. Верещагин Н.В., Моргунов В.А., Гулевская Т.С. Патология головного мозга при атеросклерозе и артериальной гипертензии. М.: Медицина, 1997.

2. Соколова И.Б., Рыжак Г.А., Мельникова Н.Н. и др. Влияние пептидного биорегулятора сосудов на плотность микрососудистой сети коры головного мозга старых крыс // Бюл. экспер. биол. 2016. Т. 161. № 2. С. 266–269.

3. Соколова И.Б., Сергеев И.В., Дворецкий Д.П. Влияние повышенного артериального давления на микроциркуляцию в коре головного мозга молодых крыс // Бюл. экспер. биол. 2015. Т. 160. № 9. С. 276–279.

4. Соколова И.Б., Сергеев И.В., Рыжак Г.А., Хавинсон В.Х. Влияние пептидного биорегулятора сосудов на микроциркуляцию в коре головного мозга у старых крыс // Успехи геронтол. 2016. Т. 29. № 2. С. 291–296.

5. Соколова И.Б., Сергеев И.В., Федотова О.Р. и др. Возрастные изменения микроциркуляции в коре головного мозга у крыс-гипертоников // Успехи геронтол. 2016. Т. 29. № 4. С. 567–572.

6. Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Рыжак Г.А. Пептидные геропротекторы — эпигенетические регуляторы физиологических функций организма. СПб.: Из-во РГПУ им. А.И. Герцена, 2014.

7. Davissou R. Hypertension and cerebrovascular dysfunction // Cell Metab. 2008. Vol. 7. № 6. P. 476–484.

8. Feihl F., Liaudet L., Waeber B., Levy B. Hypertension A disease of the microcirculation? // Hypertension. 2006. № 48. P. 1012–1017.

9. Gray S. Spontaneous hypertension in the neonatal rat. A review // Clin. exp. Hypertens. 1984. Vol. 6. № 4. P. 755–781.

10. Iadecola C., Park L., Capone C. Threats to the mind aging, amyloid, and hypertension // Stroke. 2009. № 40. P. S40–S44.

11. Intengan H., Schiffrin E. Vascular remodeling in hypertension // Hypertension. 2001. № 38. P. 581–587.

12. Jennings J., Muldoon M., Ryan C. et al. Reduced cerebral blood flow response and compensation among patients with untreated hypertension // Neurology. 2005. Vol. 64. № 8. P. 1358–1365.

13. Pires P., Ramos C., Matin N., Dorrance A. The effects of hypertension on the cerebral circulation // Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2013. № 304. P. H1598–H1614.

14. Ryzhak A., Rutkovskaya V., Ryzhak G., Kuznik B. The antiatherosclerotic effects of a geroprotector peptide // Adv. Geront. 2012. Vol. 2. № 4. P. 332–335.

15. Tagami M., Nara Y., Kubota A. et al. Ultrastructural characteristics of occluded perforating arteries in stroke-prone spontaneously hypertensive rats // Stroke. 1987. № 18. P. 733–740.

Adv. geront. 2017. Vol. 30. № 5. P. 671–675

I.B. Sokolova¹, G.A. Ryzhak², V.Kh. Khavinson^{1,2}

FUNCTIONAL CUMULATION OF INFLUENCE OF VASCULAR PEPTIDE BIOREGULATOR ON MICROCIRCULATION IN THE BRAIN CORTEX OF SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

¹ I. P. Pavlov Institute of Physiology, RAS, 6, Makarova Emb., St. Petersburg, 199034; e-mail: sib@kolt.infran.ru;

² Saint-Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, 3, Dinamo Av., St. Petersburg, 197110

We investigated the influence of vascular peptide bioregulator on microcirculation in the brain cortex of spontaneously hypertensive rats of different ages and figured out whether there is functional cumulation during two-time application of the drug «Slavinorm» by above-mentioned animals. It was shown that a single course treatment with vascular peptide bioregulator had increased the density of microvascular network of the pia mater in young animals ca. 1,2-fold and had not affected the perfusion and oxygen saturation of sensorimotor cortex. The second course treatment with «Slavinorm» was provided in a 6 months. Functional cumulation was revealed in 12 month-aged rats which had 2 course treatments with vascular peptide bioregulation: the density of microvascular network of the pia mater was increased ca. 1,6-fold; level of perfusion was increased ca. 15% in comparison with intact animals of the same age. These animals were more tolerant to cerebral vasospasm (the application of vasoconstrictor on the surface of the brain): the highest level of tissue oxygen saturation was remained at fairly constant perfusion in comparison with other animals.

Key words: vascular peptide bioregulator, brain, hypertension, density of microvascular network, perfusion, oxygen saturation, young and old animals