

И. Б. Соколова¹, И. В. Сергеев¹, Г. А. Рыжак², В. Х. Хавинсон^{1,2}

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДНОГО БИОРЕГУЛЯТОРА СОСУДОВ НА МИКРОЦИРКУЛЯЦИЮ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА У СТАРЫХ КРЫС

¹ Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034 Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6; e-mail: sib@kolt.infran.ru;

² Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, 197110 Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3

С помощью телевизионной установки для прижизненного исследования микроциркуляции в головном мозге было выявлено, что после курсового применения пептидного биорегулятора сосудов у старых крыс в возрасте 22–24 мес значительно увеличивалась (примерно в 2,5–2,8 раза) плотность микрососудистой сети пиальной оболочки; усилились констрикторные и дилататорные реакции пиальных артериол при аппликации на поверхность мозга норадреналина или ацетилхолина, соответственно. При этом перфузия в ткани коры головного мозга не повышалась, но возрастала степень сатурации крови в микрососудах этой тканевой области.

Ключевые слова: пептидный биорегулятор сосудов, старые животные, плотность микрососудистой сети, реактивность артерий, головной мозг

В связи с увеличением продолжительности жизни в экономически развитых странах разработка новых лекарственных препаратов, направленных на увеличение ресурса жизнедеятельности организма и улучшение качества жизни в преклонном возрасте, — одна из наиболее актуальных задач, стоящих перед современными медициной и биологией. Пептидный биорегулятор сосудов «Славином» разработан в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии. Он представляет собой комплекс полипептидов с молекулярной массой 72–678 Да, экстрагированных из сосудов телят. В медицинской практике планируется использование Славинома в качестве ангиопротектора. Ранее полученные результаты в экспериментах *in vitro* показали, что Славином оказывает тканеспецифическое действие, стимулируя рост эксплантатов ткани сосудов у молодых и старых крыс в органотипических культурах [6, 8, 10].

Цель представленной работы — изучение влияния пептидного биорегулятора «Славином» на микроциркуляцию в коре головного мозга у старых крыс.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на крысах-самцах линии *Wistar–Kyoto*. 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 три группы животных: 1-я — интактные крысы в возрасте 2–3 мес, $n=20$; 2-я — интактные крысы в возрасте 22–24 мес, $n=13$; 3-я — крысы в возрасте 22–24 мес, которым за 2 мес до исследования был введен пептидный биорегулятор «Славином», $n=12$. Введение препарата «Славином» (0,25 мг) животным 22–24 мес осуществляли внутримышечно по схеме: одна инъекция в сутки в течение 5 дней, перерыв 2 сут, одна инъекция в сутки в течение 5 дней. Визуализацию, мониторинг микрососудистой сети, исследование реактивности пиальных артерий, измерение скорости кровотока и сатурации крови в сосудах сенсомоторной коры головного мозга проводили через 2 мес после курсового введения Славинома. Крыс наркотизировали зоветилом — 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 с температурой 37 °С.

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

подсчитывали общее число сосудов и отдельно — артерий на единицу площади. Реактивность пиальных артерий — измерение диаметра микрососудов до и после воздействия — изучали при аппликации на поверхность мозга растворов норадrenalина — *NA* (вазоконстриктор) и ацетилхолина — *ACH* (вазодилататор) в концентрации 10^{-6} М при общем увеличении оптической системы 160 крат.

Для измерения скорости тканевого кровотока в сенсомоторной коре головного мозга и сатурации (SO_2) крови в микроциркуляторном русле использовали комплекс многофункциональной лазерной диагностики «ЛАКК-М» (НПП «Лазма», Россия). Данный комплекс определяет динамическую характеристику микроциркуляции крови (показатель микроциркуляции) — изменение потока крови в единицу времени в исследуемом объеме ткани около 1 мм^3 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 показатель микроциркуляции и SO_2 регистрировали на поверхности каждого полушария в четырех точках

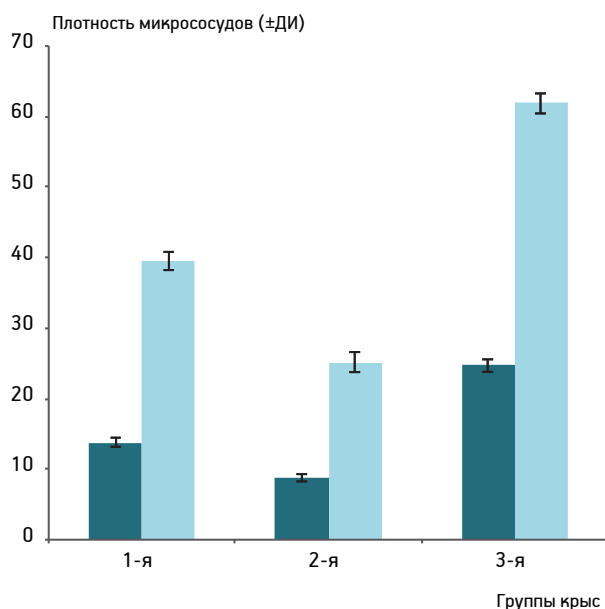


Рис. 1. Плотность микрососудистой сети пиальной оболочки сенсомоторной коры у молодых и старых крыс интактных групп и у крыс 3-й группы после курсового введения пептидного биорегулятора сосудов «Славиноорм».

Темные столбики — плотность артериального участка микрососудистой сети пиальной оболочки сенсомоторной коры головного мозга ($p \leq 0,05$); серые столбики — плотность всей микрососудистой сети пиальной оболочки сенсомоторной коры головного мозга ($p \leq 0,05$)

с приблизительными координатами $AP=1, 2, 3, 4$ мм от брегмы; $SD=1$ мм латерально от сагиттального шва. Температуру тела животных в течение всего опыта поддерживали на уровне 37°C ; САД у старых крыс в среднем составляло 120–140 мм рт. ст.

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

Результаты и обсуждение

Ранее мы доказали, что по мере старения плотность микрососудистой сети в коре головного мозга у крыс линии *Wistar–Kyoto* понижается примерно в 1,6–1,8 раза [3]. Курсовое применение Славиноорма привело к увеличению плотности всей микрососудистой сети пиальной оболочки у животных 22–24 мес примерно в 2,5 раза по сравнению со старыми крысами интактных групп. Плотность артериального участка микрососудистой сети пиальной оболочки повысилась в среднем в 2,8 раза (рис. 1). Значительная активация ангио- и артериогенеза в головном мозгу старых животных компенсировала сосудистое запустевание мозговой ткани, которое наблюдали у старых крыс [7, 11]. Высокая плотность микрососудистого русла позволяет поддерживать газообмен между кровью и тканью на уровне, препятствующем формированию ишемизированных зон в головном мозге и развитию таких заболеваний, как дисциркуляторная энцефалопатия.

Как известно, при аппликации на поверхность мозга любого вазореактивного препарата часть пиальных артерий имеет прямую реакцию: их диаметр под воздействием констриктора уменьшается и увеличивается при применении дилататора; диаметр других микрососудов, наоборот, под воздействием констриктора увеличивается, а под воздействием дилататора уменьшается; и небольшая группа пиальных артерий вообще не реагирует на воздействие [1, 4, 9]. Мы выявили значительные отличия в реактивности пиальных артерий у молодых (1-я группа), старых крыс интактной группы (2-я группа) и животных, получавших Славиноорм (3-я группа). Так, в 3-й группе, по сравнению с другими группами, более чем на 30% увеличилось число пиальных артерий, ответивших на *NA* констрикцией. Соответственно, уменьшилось число сосудов с парадоксальной реакцией — дилатацией (рис. 2, а). У животных при воздействии

NA различилось не только число артерий, прореагировавших тем или иным образом, но и степень уменьшения диаметра. Этот показатель информативнее рассматривать не в общей массе данных по всем сосудам, а отдельно по каждому порядку ветвления артериального дерева (см. рис. 2, б). У старых животных степень сужения мельчайших артерий и артериол 3–5-го порядка статистически значимо больше, чем у молодых крыс. У старых животных, получавших препарат «Славинорм», констрикция возрастает по сравнению с крысами интактной группы того же возраста и значительно превышает этот показатель у молодых животных (см. рис. 2, в). Вероятно, эти результаты нужно рассматривать как отрицательные. В старости достаточно высока предрасположенность к спазмам сосудов головного мозга, что подтверждают наши результаты, полученные у старых животных интактной группы. Применение Славинорма усиливало спазмирование пиальных артерий под воздействием констриктора.

Под воздействием вазодилатора АСН число артерий, ответивших прямой или парадоксальной реакцией или не прореагировавших на воздействие, во всех трех экспериментальных группах было примерно одинаковым (рис. 3, а). При этом степень расширения артерий у животных разных групп отличается достаточно значимо: у молодых крыс на АСН большей дилатацией отвечали крупные артерии 1-го порядка, а у старых — мелкие сосуды 3–5-го порядка. Такая же тенденция сохранялась и у старых животных, получавших Славинорм (см. рис. 3, б). Кроме того, более значимым увеличением диаметра, по сравнению с крысами 2-й группы, прореагировали артерии 1–2-го порядка.

Увеличение плотности микрососудистой сети пиальной оболочки у старых животных после применения пептидного биорегулятора сосудов не повлияло на показатель микроциркуляции в коре головного мозга (рис. 4, а). Как видно из данных рисунка, показатель микроциркуляции у старых крыс 2-й и 3-й экспериментальных групп статистически значимо ниже, чем у молодых животных. Вероятно, скорость тканевого кровотока в коре

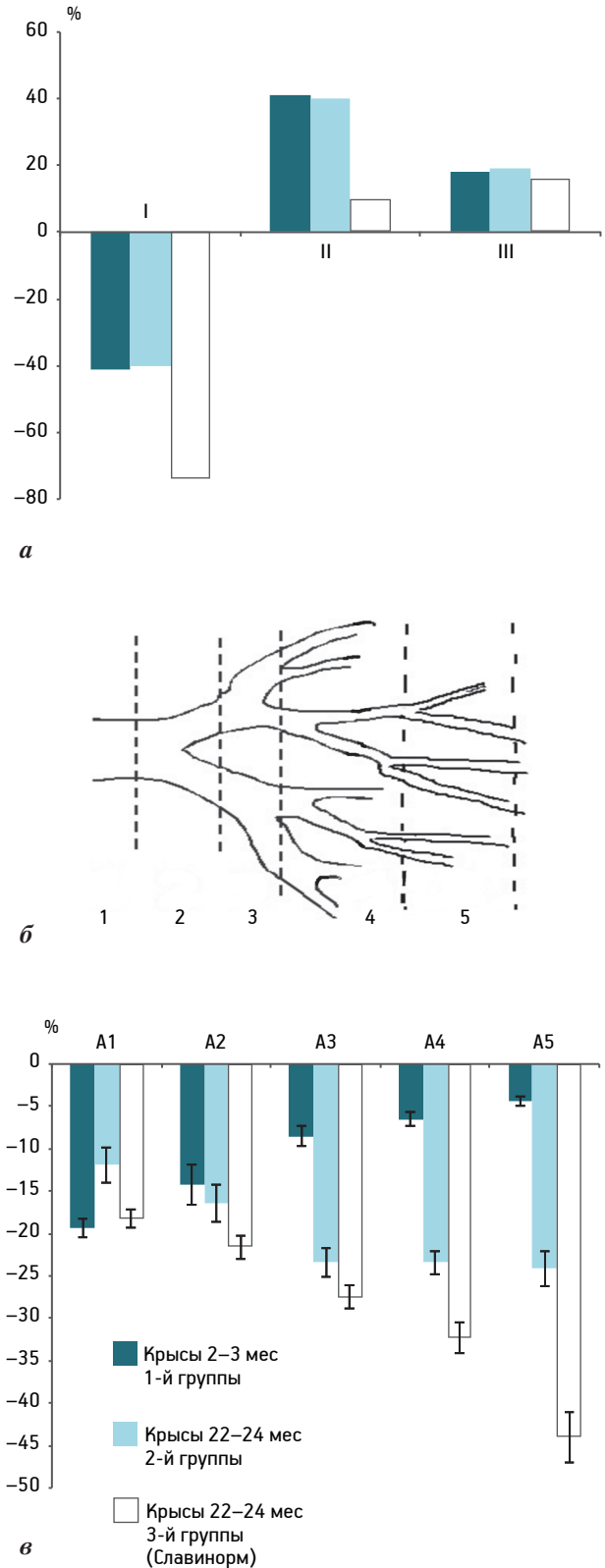
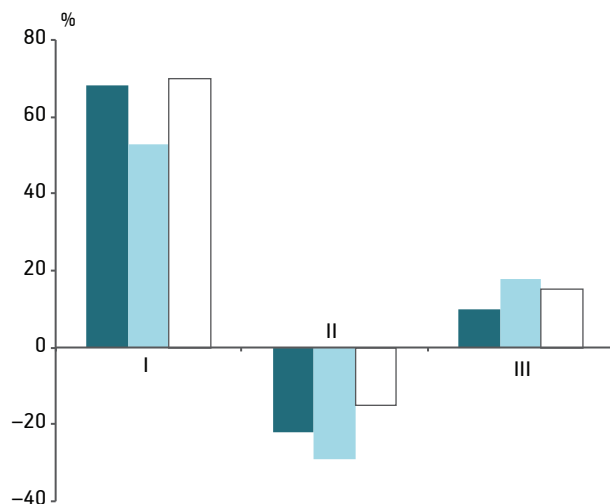
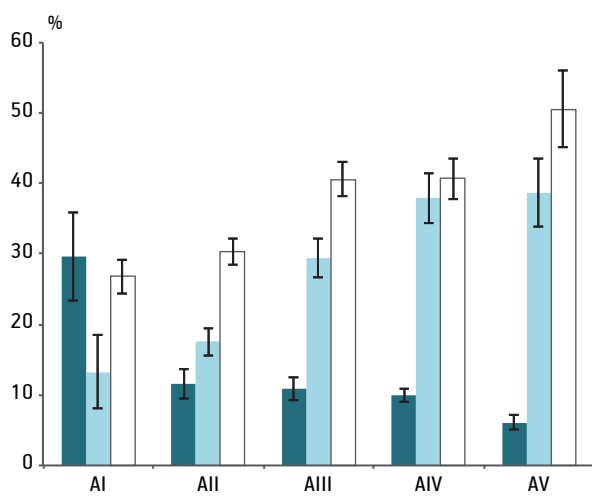


Рис. 2. Изменение реактивности пиальных артерий сенсомоторной коры головного мозга у крыс под воздействием норадреналина (NA).

а — процентное соотношение пиальных артерий, прореагировавших различным образом на воздействие NA: I — артериолы, ответившие на воздействие NA констрикцией; II — артериолы, ответившие на воздействие NA дилатацией; III — артериолы, не прореагировавшие на воздействие NA; б — схематическое изображение артериального сосуда пиальной оболочки коры головного мозга, цифрами обозначен порядок ветвления артерий; в — степень изменения диаметра пиальных артерий, прореагировавших констрикцией на воздействие NA ($p \leq 0,05$), по оси ординат — степень уменьшения диаметра пиальных артерий, (\pm ДИ); по оси абсцисс — порядок ветвления пиальных артерий



а



б

- Крысы 2–3 мес 1-й группы
- Крысы 22–24 мес 2-й группы
- Крысы 22–24 мес 3-й группы (Славинорм)

Рис. 3. Изменение реактивности пиальных артерий сенсомоторной коры головного мозга у крыс под воздействием ацетилхолина (АСН).

а — процентное соотношение пиальных артериол, прореагировавших различным образом на воздействие АСН: I — артериолы, ответившие на воздействие АСН дилатацией; II — артериолы, ответившие на воздействие АСН констрикцией; III — артериолы, не прореагировавшие на воздействие АСН; б — степень изменения диаметра пиальных артерий, прореагировавших дилатацией на воздействие АСН ($p \leq 0,05$); по оси ординат — степень увеличения диаметра пиальных артерий (\pm ДИ); по оси абсцисс — порядок ветвления пиальных артерий

головного мозга определяется не столько числом микрососудов и их реактивностью, а, в большей степени, сердечным выбросом, скоростью крово-

тока в малом круге кровообращения и т. д. В связи с тем, что в измеряемом объеме ткани значительно увеличилось число артерий, возросла и доля артериальной крови с высоким SO_2 , а следовательно, повысилась и тканевая SO_2 (см. рис. 4, б).

С помощью комплекса многофункциональной лазерной диагностики «ЛАКК-М» мы смогли оценить еще один важный параметр микроциркуляции — удельное потребление кислорода (в относительных единицах) [2]. Этот показатель составлял 0,36; 0,47 и 0,21 отн. ед. у молодых, старых животных интактных групп и старых крыс, получавших Славинорм, соответственно. Эти данные показывают, что наибольшее количество кислорода в коре головного мозга было утилизировано у старых крыс интактной группы. Вероятно, это происходило из-за понижения скорости тканевого кровотока и увеличения расстояния между артериями. В этих условиях увеличивался градиент pO_2 между кровью и тканью, и за единицу времени из микрососудов диффундировало больше кислорода, чем у молодых животных. Следовательно, к более глубоким структурам мозга поступала обедненная кислородом кровь. Значительное повышение плотности микроциркуляторной сети существенно понизило градиент pO_2 между кровью и тканью, и при одинаковом показателе микроциркуляции утилизация кислорода у старых животных 3-й группы сократилась почти в 2 раза. Соответственно, к более глубоким структурам мозга поступала кровь с высоким содержанием кислорода.

Заключение

Итак, в результате применения одного курса пептидного биорегулятора «Славинорм» у старых животных были получены следующие изменения основных параметров микроциркуляции в коре головного мозга.

Более чем в 2,5 раза повысилась плотность микрососудистой сети и ее артериального участка в пиальной оболочке коры головного мозга, — этот результат мы, несомненно, оцениваем как *положительный*.

Мелкие пиальные артерии и артериолы имели повышенную констрикторную реакцию при воздействии вазоконстриктора и дилататорную — при воздействии вазодилататора; вероятно, такая «готовность» микрососудов к изменению диаметра носит, скорее, *отрицательный* характер. Пиальные сосуды принимают непосредственное участие в регулировании скорости мозгового кровотока, — их

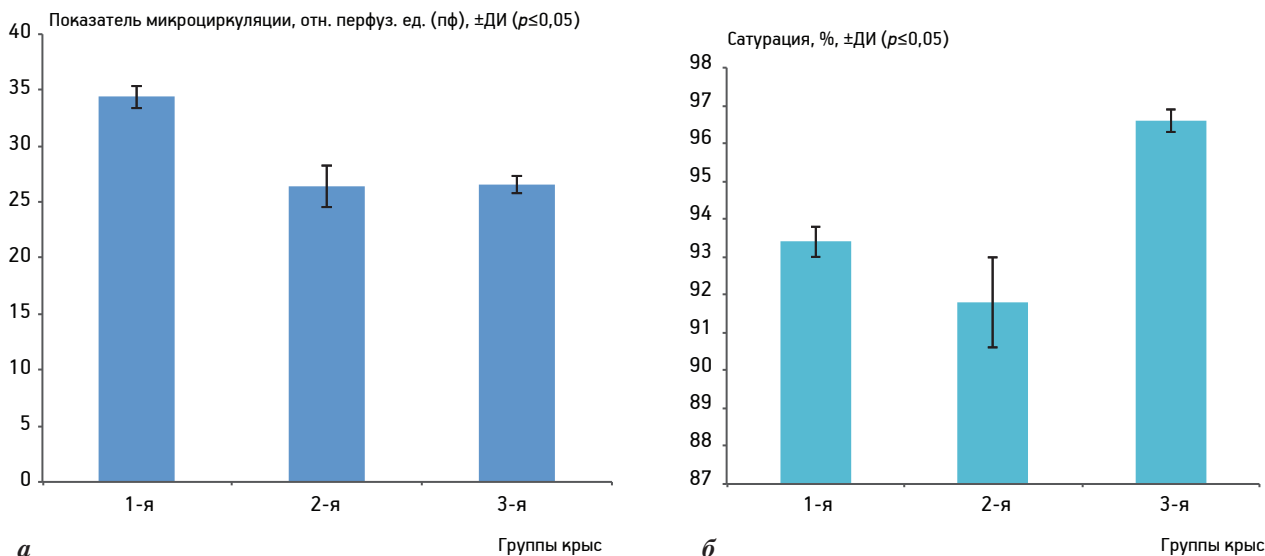


Рис. 4. Микроциркуляция в сенсомоторной коре головного мозга у крыс разного возраста.

а — перфузия в сенсомоторной коре головного мозга; б — сатурация (SO_2) смешанной крови в микрососудистой сети сенсомоторной коры головного мозга

задача поддерживать неизменным уровень кровотока при изменении эндогенных или экзогенных условий. При повышенной реактивности пияльных артерий любое воздействие может привести к неадекватному изменению скорости мозгового кровотока.

Не выявлено повышения уровня перфузии ткани коры головного мозга. Само по себе понижение показателя микроциркуляции — патологическое явление, означающее ухудшение снабжения мозга кислородом. Но повышение плотности микрососудистой сети, за счет чего все поле тканевого ρO_2 поддерживается на высоком уровне, может компенсировать возрастное понижение показателя микроциркуляции. Относительно этого параметра мы затрудняемся дать положительную или отрицательную оценку воздействия препарата «Славинорм» на микроциркуляцию.

Повышение сатурации смешанной крови в микрососудах коры головного мозга мы расцениваем как *положительный* результат: именно за счет такого «запаса кислорода» старые животные лучше переносят ишемические атаки и спазм сосудов головного мозга [5].

Вышеназванные изменения в микроциркуляции привели к уменьшению утилизации кислорода из крови микрососудов на уровне ткани коры, следовательно, к более глубоким структурам головного мозга поступала богатая кислородом кровь — это *положительный* результат.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности изучения пептидного биорегулятора «Славинорм» в качестве ангиопротектора у лиц с

возрастными нарушениями микроциркуляции головного мозга.

Литература

1. Горшкова О.П., Ленцман М.В., Азтемьева А.И., Дворецкий Д.П. Динамика изменения реактивности пияльных сосудов после кратковременной ишемии головного мозга // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2015. Т. 14. № 1 (53). С. 74–78.
2. Рогаткин Д.А. Физические основы оптической оксиметрии // Мед. физика. 2012. № 2. С. 97–114.
3. Соколова И.Б., М. Пузанов М.В., Мельникова Н.Н. и др. Возрастные изменения микроциркуляции в пияльной оболочке сенсомоторной коры головного мозга крыс // Успехи геронтол. 2013. Т. 26. № 3. С. 437–441.
4. Соколова И.Б., Сергеев И.В., Анисимов С.В. и др. Влияние интрацеребральной трансплантации мезенхимных стволовых клеток на реактивность пияльных артериол у старых крыс // Клеточные технологии в биол. и мед. 2014. № 2. С. 81–83.
5. Соколова И.Б., Пузанов М.В., Мельникова Н.Н. и др. Возрастные изменения скорости кровотока и сатурации крови в коре головного мозга у крыс // Успехи геронтол. 2015. Т. 28. № 3. С. 466–471.
6. Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Рыжак Г.А. Пептидные геропротекторы — эпигенетические регуляторы физиологических функций организма. СПб.: РГПУ им. А.И.Герцена, 2014.
7. Brown W., Thore C. Cerebral microvascular pathology in aging and neurodegeneration // Neuropathol. applyde neurobiol. 2011. Vol. 37. № 1. P. 56–74.
8. Khavinson V.Kh., Kuznik B.I., Ryzhak G.A. Peptide bio-regulators: a new class of geroprotectors. Message 1: results of experimental studies // Adv. geront. 2013. Vol. 3. № 3. P. 225–235.
9. Mayhan W., Arrick D., Sharpe G., Sun H. Age-related alterations in reactivity of cerebral arterioles: role of oxidative stress // Microcirculation. 2008. № 15. P. 225–236.
10. Ryzhak A.P., Kuznik B.I., Rutkovskaya V.N., Ryzhak G.A. The antiatherosclerotic effects of a geroprotector peptide // Adv. geront. 2012. Vol. 2. № 4. P. 332–335.
11. Shao W., Li C., Chen I. et al. Stereological investigation of age-related changes of the capillaries in white matter // Anatomical record (Hoboken). 2010. Vol. 293. № 8. P. 1400–1407.

I. B. Sokolova¹, I. V. Sergeev¹, G. A. Ryzhak², V. Kh. Khavinson²

**THE EFFECT OF VASCULAR PEPTIDE BIOREGULATOR ON THE MICROCIRCULATION
IN THE BRAIN CORTEX OF OLD RATS**

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

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

Using a TV device to study brain microcirculation, we found that after a course of vascular peptide bioregulator the density of microvascular network of pia matter of old rats (22–24 months) sensorimotor cortex increased about 2,5–2,8 times compared to control old rats; and noradrenaline-induced constriction reactions and acetylcholine-induced dilative reactions of the pial arterioles increased significantly. This perfusion in the tissue of the cerebral cortex is not increased, but the degree of blood oxygen saturation in the microvasculature of this tissue region raised.

Key words: *vascular peptide bioregulator, old animals, density of microvascular network, reactivity arterioles, brain*